

Die Aktivierung sarkolemmaler ATPasen des Rattenherzens  
durch Isoproterenol

vorgelegt von

Johann Liebl

München 77







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Aus der Forschergruppe Diabetes und  
der III. med. Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing  
(Direktor: Prof. Dr. H. Mehnert)

Die Aktivierung sarkolemmaler ATPasen des Rattenherzens  
durch Isoproterenol

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Johann Liebl

aus

Riedlhütte

München 1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. K.D. Hepp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.7.1977



1. GEMEINSAM

2. SONNENLICHTE UND SONNENSTRAHLEN

A. Sonnenlicht

B. Wärme

C. Schall

D. Magnetismus und elektrischer Strom

E. Lichtstrahlen

F. Schwingungen und Wellen

G. Elektrizität

H. Magnetismus

I. Licht und Wärme

Meinen Eltern

A. Einleitung

B. Die Entstehung der Welt

C. Die Entwicklung der Menschheit

D. Die Wissenschaften

E. Die Künste

F. Die Religionen

G. Die Philosophie

H. Die Literatur

I. Die Wissenschaften und Künste

J. Die Religionen und Philosophie

K. Die Literatur

L. Die Wissenschaften

M. Die Künste





# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                              | Seite |
|--------------------------------------------------------------|-------|
| A. Einleitung                                                | 1     |
| B. Methodik und Material                                     | 6     |
| I. Chemikalien                                               | 6     |
| II. Tiere                                                    | 6     |
| III. Präparation                                             | 6     |
| IV. Reinheitskriterien der Präparationsmethode               | 12    |
| V. Herstellung von Tris-ATP                                  | 17    |
| VI. Proteinbestimmung                                        | 18    |
| VII. Enzymmessungen                                          | 19    |
| 1. Alkalische Phosphatase                                    | 19    |
| 2. $\text{Ca}^{++}$ -ATPase                                  | 20    |
| 3. $(\text{Mg}^{++} + \text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase | 21    |
| 4. Succinatdehydrogenase                                     | 22    |
| 5. Phosphattest                                              | 23    |
| VIII. Berechnungen                                           | 24    |
| IX. Statistik                                                | 24    |
| C. Ergebnisse                                                | 25    |
| I. Alkalische Phosphatase                                    | 25    |
| 1. Rechter Vorhof (Homogenat)                                | 25    |
| 2. Ventrikel                                                 | 28    |
| a) Homogenat                                                 | 28    |
| b) Zellfraktionen                                            | 28    |

|      |                                                                           |    |
|------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| II.  | $\text{Ca}^{++}$ -ATPase in Homogenat und Zellfraktionen des Ventrikels   | 31 |
|      | 1. Verteilung                                                             | 31 |
|      | 2. Isoproterenol-Wirkung                                                  | 31 |
| III. | ATPasen des Sarkolemm                                                     | 34 |
|      | 1. Beeinflussung der $\text{Ca}^{++}$ -ATPase durch                       |    |
|      | a) Isoproterenol                                                          | 34 |
|      | b) Cycloheximid                                                           | 34 |
|      | c) Kombination beider Stoffe                                              | 34 |
|      | 2. Beeinflussung der $\text{Mg}^{++}$ -ATPase durch                       |    |
|      | a) Isoproterenol                                                          | 36 |
|      | b) Cycloheximid                                                           | 36 |
|      | c) Kombination beider Stoffe                                              | 36 |
|      | 3. Beeinflussung der $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase durch       |    |
|      | a) Isoproterenol                                                          | 38 |
|      | b) Cycloheximid                                                           | 38 |
|      | c) Kombination beider Stoffe                                              | 38 |
| IV.  | Untersuchung über die Beziehungen der sarkolemmalen ATPasen untereinander | 40 |
| D.   | Diskussion                                                                | 43 |
| E.   | Zusammenfassung                                                           | 52 |
| F.   | Literatur                                                                 | 54 |

## Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

|                                                                                                                                                     | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Tabelle 1 : Verteilung der Markerenzyme                                                                                                             | 13    |
| Tabelle 2 : Aktivitäten zu Abb. 3                                                                                                                   | 27    |
| Tabelle 3 : Aktivitäten zu Abb. 4                                                                                                                   | 29    |
| Tabelle 4 : Aktivitäten zu Abb. 5                                                                                                                   | 32    |
| Tabelle 5 : Aktivitäten zu Abb. 6                                                                                                                   | 35    |
| Tabelle 6 : Aktivitäten zu Abb. 7                                                                                                                   | 37    |
| Tabelle 7 : Aktivitäten zu Abb. 8                                                                                                                   | 39    |
| Abb. 1 : Präparationsschema                                                                                                                         | 9     |
| Abb. 2 a-c : Elektronenmikroskopische Aufnahmen<br>der Zellfraktionen                                                                               | 14-16 |
| Abb. 3 : Alkalische Phosphatase des rechten<br>Vorhofs; Effekt von Isoproterenol,<br>Cycloheximid und Propranolol                                   | 27    |
| Abb. 4 : Verteilung der alkalischen Phosphatase<br>in Myokardfraktionen der Ratte                                                                   | 30    |
| Abb. 5 : Verteilung der $\text{Ca}^{++}$ -ATPase in Homogenat<br>und Zellfraktionen des Ventrikels bei<br>unbehandelten und Isoprot.-behand. Tieren | 33    |
| Abb. 6 : $\text{Ca}^{++}$ -ATPase des Sarkolemms<br>Effekt von Isoproterenol und Cycloheximid                                                       | 35    |
| Abb. 7 : $\text{Mg}^{++}$ -ATPase des Sarkolemms<br>Effekt von Isoproterenol und Cycloheximid                                                       | 37    |
| Abb. 8 : $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase des Sarkolemms<br>Effekt von Isoproterenol und Cycloheximid                                       | 39    |
| Abb. 9 : Korrelation zwischen $\text{Ca}^{++}$ -ATPase und<br>$\text{Mg}^{++}$ -ATPase des Sarkolemms                                               | 42    |

## Verwendete Abkürzungen

|                |                                                                |
|----------------|----------------------------------------------------------------|
| ADP            | Adenosindiphosphat                                             |
| AMP            | Adenosinmonophosphat                                           |
| AP             | alkalische Phosphatase                                         |
| ATP            | Adosintriphosphat                                              |
| cAMP           | cyclisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat                          |
| EDTA           | Äthylendinitrotetraessigsäure                                  |
| EGTA           | Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyläther)-N,<br>N'-tetraessigsäure |
| E-P            | phosphoryliertes Enzym                                         |
| i.p.           | intraperitoneal                                                |
| NADP           | Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-<br>phosphat               |
| n.s.           | nicht signifikant                                              |
| P <sub>i</sub> | anorganisches Phosphat                                         |
| P-P            | Pyrophosphat                                                   |
| RNA            | Ribonucleinsäure                                               |
| s.c.           | subkutan                                                       |
| SDH            | Succinatdehydrogenase                                          |
| TCE            | Trichloressigsäure                                             |
| Tris           | Trishydroxymethylaminomethan                                   |

## A ) E I N L E I T U N G

In den letzten Jahren ist die Rolle der Plasmamembran als Grenzfläche zwischen Extra- und Intrazellulärraum, sowie ihre Funktion beim aktiven Stofftransport Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen gewesen. (5,23,27,28,34,38,39)

Durch den Nachweis spezifischer Hormonrezeptoren an den Plasmamembranen ist es darüber hinaus gelungen, tieferen Einblick in den Mechanismus der Signalübermittlung von Hormonen auf den Zellstoffwechsel zu erhalten. (1,5,10, 23,33,34,50)

Von besonderem Interesse erschien in diesem Zusammenhang der Einfluß der Hormone auf die Systeme für den aktiven Transport von Ionen durch die Plasmamembran. Als biochemisches Substrat für den aktiven Transport gelten sogenannte Transport-ATPasen. So wurden in nahezu allen Plasmamembranfraktionen ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPasen, die für den Transport von monovalenten Kationen verantwortlich sein sollen, gefunden. (3,25,27,44,48,51)

In einigen Plasmamembranfraktionen wurden  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasen beschrieben, die den Transport von divalenten Kationen katalysieren sollen. (5,6,7,12,19,26)

Ein Ca-Transportsystem wurde schon lange postuliert, da zwischen dem Extrazellulärraum ( $[\text{Ca}^{++}] = 10^{-3} \text{ M}$ ) und dem Intrazellulärraum ( $[\text{Ca}^{++}] = 10^{-6} \text{ M}$ ) ein drei Zehnerpotenzen umfassender elektrochemischer Gradient besteht,

für dessen Aufrechterhaltung Energie erforderlich ist. Am besten untersucht sind diese Austauschvorgänge in der Muskulatur, da dort  $\text{Ca}^{++}$ -Verschiebungen die wichtigste Stellgröße im elektromechanischen Koppelungsprozeß darstellen. (12,18,23)

Erstmals konnte von HASSELBACH und MAKINOSE 1961 am Skelettmuskel ein energieverbrauchender aktiver  $\text{Ca}^{++}$ -Transport aus dem Intra- in den Extrazellulärraum entgegen dem elektrochemischen Gradienten beschrieben und als eine  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase definiert werden. (18)

An der Muskulatur lassen sich neben den Mitochondrien zwei Membransysteme unterscheiden, das Sarkolemm und das sarkoplasmatische Retikulum, wobei sich Herz- und Skelettmuskulatur deutlich in Funktion und Struktur unterscheiden. So erfolgt die Erregung des Skelettmuskels nur auf dem Nervenweg, die Erregung des Herzmuskels jedoch spontan rhythmisch in dazu spezialisierten Muskelfasern.

Das Sarkolemm des Myokards besteht aus einer dünnen, elektronendichten Außen- und einer dickeren Innenmembran, von denen die gesamte Zelle umschlossen wird.

Die innere Zellmembran besteht aus Mucopolysacchariden und besitzt eine Vielzahl von negativ geladenen Bindungsstellen, welche Kationen aufzunehmen vermögen. (5)

In Form transversaler Tubuli (T-System) stülpt sich das Sarkolemm weit ins Faserinnere des Myokards vor. Darüber hinaus sind auch Längsverbindungen zwischen den transversalen Tubuli nachgewiesen worden, die parallel zu den Myofibrillen verlaufen. (5)

Das T-System kommt dadurch in engen Kontakt mit den

endoplasmatischen  $\text{Ca}^{++}$ -Speichern. (sarkoplasmatisches Retikulum)

Man nimmt heute an, daß sich das Aktionspotential vom Sarkolemm über das T-System ausbreitet und aus den endoplasmatischen  $\text{Ca}^{++}$ -Speichern durch Erhöhung der Membranpermeabilität  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen in den Intrazellulärraum freisetzt.

Diese endoplasmatischen  $\text{Ca}^{++}$ -Speicher sind jedoch im Myokard, im Gegensatz zur Skelettmuskulatur, nur schwach ausgebildet, so daß die elektromechanische Koppelung dort sehr stark vom extrazellulären Calcium abhängt. (12) Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration führt dann zur Aktivierung des kontraktile Apparates und induziert damit die Umwandlung von chemischer Energie (ATP) in mechanische Energie (Kontraktion). Durch die  $\text{Ca}^{++}$ -Pumpe im sarkoplasmatischen Retikulum und Sarkolemm wird das  $\text{Ca}^{++}$  aus dem Cytosol der Zelle transportiert, zum Teil in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums hinein, zum Teil in den Extrazellulärraum durch das Sarkolemm hindurch. Dadurch wird die intrazelluläre  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration unter den Schwellenwert für die Aktivierung des Kontraktionsvorgangs gesenkt und es kommt zur Relaxation des Muskels.

Zwischen dem aktiven  $\text{Ca}^{++}$ -Transport und dem ATP-Verbrauch besteht eine quantitative Beziehung, wobei z.B. am Skelettmuskel bei einer  $[\text{Ca}^{++}] < 1 \mu\text{M}$  in der Zelle zwei  $\text{Ca}^{++}$  unter Verbrauch von einem Molekül ATP transportiert werden. (17)



Aus zahlreichen kardiologischen Untersuchungen ergibt sich, daß der Kontraktilitätsvorgang am Herzen von Hormonen gesteuert wird. So aktivieren  $\beta$ -Sympathicomimetika, Thyroxin, Glucagon die Kontraktilität, während  $\beta$ -Blocker hemmend wirken.

Als einer der stärksten Aktivatoren der Kontraktion neben Digitalis wirkt Isoproterenol als  $\beta$ -Sympathicomimeticum. Aus Arbeiten von FLECKENSTEIN ist bekannt, daß Isoproterenol den  $\text{Ca}^{++}$ -Einstrom in die Herzmuskelzelle um das 6-10 fache zu erhöhen vermag. (12)

Dieser verstärkte  $\text{Ca}^{++}$ -Influx führt bei längerer Zufuhr von Isoproterenol durch exzessive  $\text{Ca}^{++}$ -Überladung der Zellen schließlich zum Absinken des Gehaltes an energiereichen Phosphatverbindungen und zu Myokardnekrosen. Ähnliche Schäden am Herzen lassen sich auch experimentell durch Streßzustände erzeugen. (40)

Da erhöhte Ionenströme stets durch eine Veränderung der Permeabilität der Zellmembran bedingt sind, schien es von Interesse, die Enzyme, die den Ionentransport regeln, zu untersuchen.

Von den an das Sarkolemm gebundenen Enzymen spielt die  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$  eine wichtige Rolle beim aktiven Transport von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  durch die Zellmembran, (44,51) die  $\text{Ca}^{++} - \text{ATPase}$  beim Transport von  $\text{Ca}^{++}$ . (5,6)

Ziel dieser Arbeit ist es, ausgehend von einer bereits bekannten Isoproterenolwirkung, nämlich der Stimulierung der alkalischen Phosphatase im rechten Vorhof, den Einfluß von Isoproterenol auf die ATP-spaltenden Enzyme des Ventrikels, insbesondere des Sarkolemm, zu untersuchen.



Die Untersuchung der Aktivitäten membrangebundener Enzyme und ihre Beeinflußbarkeit durch verschiedene Stoffe, insbesondere Isoproterenol und Cycloheximid, soll Gelegenheit geben, weitere Informationen über die Funktion des Herzmuskelsarkolemms und die Wirkungsweise positiv inotroper Hormone zu erfahren.

## B ) M E T H O D I K      u n d      M A T E R I A L

### I. CHEMIKALIEN

Isoproterenol (Aludrin<sup>R</sup>) wurde von der Firma Boehringer, Ingelheim, Cycloheximid (Actidion<sup>R</sup>) von der Firma Serva, Heidelberg, Propranolol (Reinsubstanz) von der Firma Sigma, München, erhalten.

Alle anderen verwendeten Chemikalien stammten von der Firma E. Merck, Darmstadt.

### II. TIERE

Für die Untersuchungen wurden männliche Sprague Dawley - Ratten mit einem Gewicht von 200-250 g verwendet. Gruppen von jeweils vier Tieren wurden durch Injektion verschiedener Substanzen vorbehandelt.

Folgende Dosierungen wurden jeweils einer Gruppe verabreicht:

- 1) Isoproterenol    40 mg/kg Körpergewicht    s.c.
- 2) Cycloheximid    1 mg/kg                        "                        s.c.
- 3) Propranolol    50 mg/kg                        "                        i.p.
- 4) Kombination von Cycloheximid und Isoproterenol  
in oben angegebener Dosierung
- 5) Kombination von Propranolol und Isoproterenol  
in oben angegebener Dosierung
- 6) Kontrollgruppe erhielt physiologische Kochsalzlösung s.c.

Bei Gruppe 4 und 5 erfolgte die Injektion von Isoproterenol eine Stunde nach Gabe von Cycloheximid bzw. Propranolol.

Zwölf Stunden nach Applikation der jeweiligen Substanzen wurden die Ratten durch Genickschlag getötet.

### III. PRÄPARATION von Herzmuskelgewebe

nach STAM, A.C. et al. (45), mod. von Dietze, G.  
und Hepp, K.D. (6)

#### 1. Pufferlösungen

##### a) Puffer I pH 7,4

85,57 g Sucrose (0,25 M), 190,2 mg EGTA (0,5 mM)  
und 2,423 g Tris (20 mM) werden in 0,9 l H<sub>2</sub>O bidest.  
gelöst, mit 1 N HCL auf pH 7,4 eingestellt und  
mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1l aufgefüllt.

##### b) Puffer II pH 7,4

584,5 mg EDTA (2 mM) werden in 1 l H<sub>2</sub>O bidest.  
gelöst und mit Tris-Substanz auf pH 7,4 eingestellt.

##### c) Puffer III pH 7,4

2,423 g Tris (20 mM) werden in 0,9 l H<sub>2</sub>O bidest.  
gelöst, mit 1 N HCL auf pH 7,4 eingestellt und  
mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 l aufgefüllt.

##### d) NaJ- Mixtur pH 7,4

Die NaJ-Mixtur wurde als Inkubationslösung für  
das Sarkolemm verwendet.

In je 10 ml Puffer III wurden gelöst:

9,9 g NaJ, 606 mg Cystein und 102 mg MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

In je 10 ml H<sub>2</sub>O bidest. wurden gelöst:

151 mg ATP-Tris (ATP-Säure mit Tris-Salz auf

pH 7,4 eingestellt),  
7,3 g EDTA-Tris (zuerst in 5 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst,  
aufgewärmt und mit Tris-Substanz auf pH 7,4 eingestellt)

Ansatz der NaJ-Mixtur:

6ml NaJ-Lösung (4 M) + 1 ml Cystein-Lösung (50 mM)  
+ 2 ml ATP-Tris-Lösung (6 mM) + 1 ml MgCl<sub>2</sub>-Lösung (5mM)  
+ 0,02 ml EDTA-Lösung (5 mM)  
Gesamtvolumen: 10,02 ml

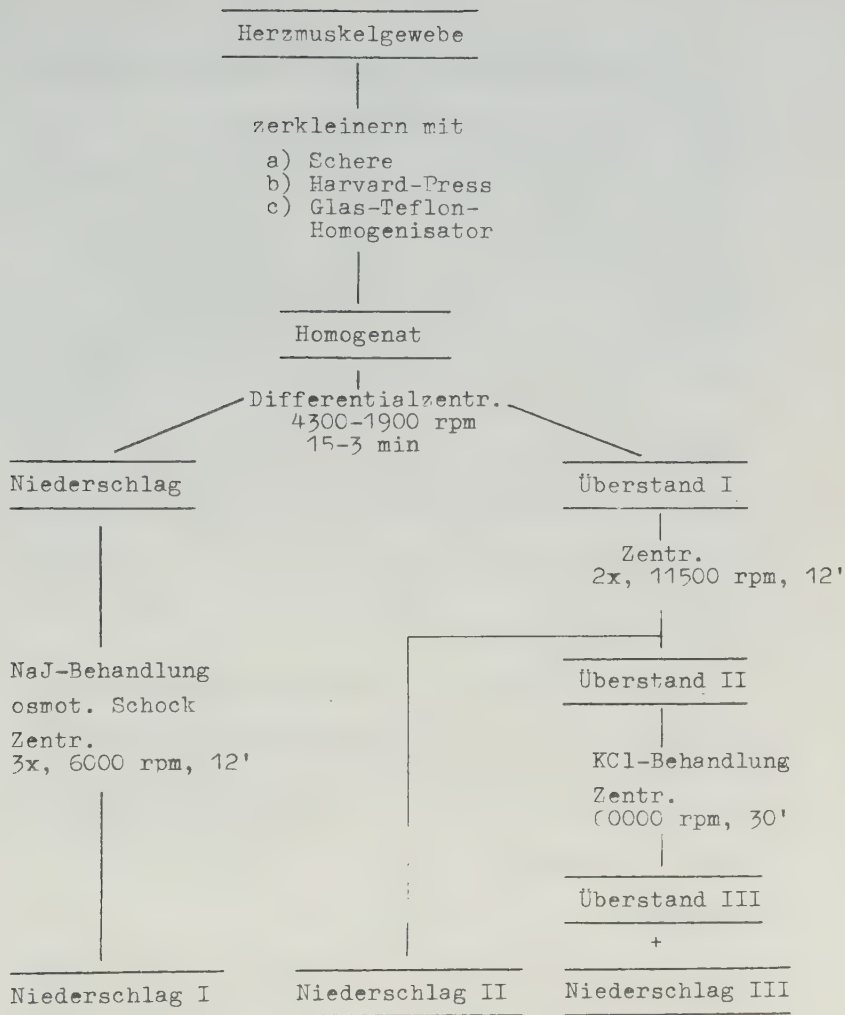
## 2. Präparation des rechten Vorhofs und der Herz- muskelorganellen

### a) Rechter Vorhof

Der rechte Vorhof wurde entfernt, zerkleinert  
und in Puffer I (1g / 40 ml) aufgenommen.  
Mit einem 30 ml Potter-Homogenisator (Glas-Teflon)  
wurde das zerkleinerte Muskelgewebe der Vorhöfe  
anschließend homogenisiert. (3x 10 sec. bei 120 Volt),  
und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

### b) Herzmuskelorganellen (Abb. 1)

Nach Entfernung der Vorhöfe, der Herzklappen  
sowie des Epikards wurde mit einer spitzen Schere  
Ventrikelgewebe gewonnen, in Puffer I eingebracht,  
durch Gaze filtriert und durch die vorgekühlte  
Harvard-Pressen getrieben. Davon wurde 1 g zerklei-  
nertes Herzmuskelgewebe in 5 ml Puffer I aufgenommen  
und mit einem 30 ml Potter-Homogenisator (Glas-  
Teflon) homogenisiert (3 x 10 sec.; 120 Volt).



Niederschlag I : Sarkolemmfraktion

Niederschlag II : Mitochondrienfraktion

Niederschlag III : Mikrosomenfraktion

Überstand I : Überstände aus den Differentialzentrif.

Überstand II : Mitochondrienüberstand

Überstand III : Mikrosomenüberstand

An die Aufbereitung schlossen sich 4 Zentrifugationen zur Trennung der Organellen an.

Die 1. Zentrifugation oder Differentialzentrifugation (Sorvall, gekühlt, SS 34 Rotor) gliederte sich in 7 Zentrifugationsschritte, wobei die Geschwindigkeit von 4300 rpm jeweils um 400 rpm und die Zeit von anfangs 15 min. jeweils um 2 min. abnahm. Nach jeder Zentrifugation wurde der Niederschlag mit dem Glasstab rehomogenisiert. Die Überstände wurden nach jeder Zentrifugation im Eisbad gesammelt, die Niederschläge in 4 ml Puffer I pro Zentrifugenröhrchen aufgenommen und mit einem Glasstab homogenisiert.

Nach dem 2. Zentrifugationsschritt (3900 rpm, 13 min.) wurde der Niederschlag zusätzlich durch Gaze filtriert. Der Niederschlag nach der Differentialzentrifugation wurde zur Gewinnung der Sarkolemmfraktion verwendet, während die gesammelten Überstände das Ausgangsmaterial für die Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion bilden. (Überstand I)

#### Sarkolemm

Der Niederschlag nach der Differentialzentrifugation wurde in 5 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen und rehomogenisiert. Dazu wurden 5 ml der NaJ-Mixtur gegeben und 60 min. bei 0° Celsius in einem Gefäß mit Magnetrührer inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 15 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O bidest. (osmotischer Schock).

Diesem osmotischen Schock folgten 3 weitere Zentrifugationen ( Sorvall, SS 34 Rotor 3x 20 min. bei 6000 rpm ). Die Überstände wurden verworfen, während die Niederschläge nach jedem Lauf in 25 ml Puffer II aufgenommen wurden. Mit dem Glasstab und dem 30 ml Potter-Homogenisator (Glas-Teflon) wurden sie anschließend rehomogenisiert. (5 x 10 sec bei 120 Volt) Der Niederschlag nach dem 3. Lauf wurde in 2 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit einem 5 ml Potter-Homogenisator (Glas-Teflon) homogenisiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -20° Celsius aufbewahrt. Er stellt die Sarkolemmfraktion dar, wie auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt wurde.

### Mitochondrien

Der Überstand I, welcher Mitochondrien und Mikrosomen enthält, wurde zentrifugiert (2 x 12 min bei 11500 rpm; Sorvall, SS 34 Rotor).

Nach dem 1. Lauf wurde der Niederschlag in 20 ml Puffer I mit dem Glasstab rehomogenisiert. Der Niederschlag nach dem 2. Lauf wurde in 2 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit dem 5 ml Potter-Homogenisator (Glas-Teflon) homogenisiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Überstände dieser Zentrifugation wurden gesammelt. (Überstand II). Er bildet das Ausgangsmaterial für die Mikrosomenfraktion.

### Mikrosomen

Überstand II wurde nach Zugabe von 26,1 mg KCl/ml ultrazentrifugiert (Beckman-Ultrazentrifuge LB 2; Ti 60-Rotor; 60 000 rpm für 30 min).

Der Niederschlag wurde in 2 ml H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen, mit einem Potter-Homogenisator (Glas-Teflon) homogenisiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### IV. REINHEITSKRITERIEN der PRÄPARATIONSMETHODE

Zur Reinheit der einzelnen Fraktionen ist zu sagen, daß sie sich sowohl nach der elektronenmikroskopischen als auch der biochemischen Charakterisierung gut voneinander trennen lassen.

Die 3 Zellorganellen werden durch die spezifischen Aktivitäten von Markerenzymen, die hauptsächlich in einer Fraktion vorkommen, charakterisiert.

Das Sarkolemm ist charakterisiert durch eine mit Strophantin hemmbare ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase, die Mitochondrien durch die Succinatdehydrogenase (SDH), die Mikrosomen durch die alkalische Phosphatase (siehe Tab. 1)

Die von uns gefundenen Werte über die Reinheit einer Fraktion stimmen mit vergleichbaren Angaben der Literatur gut überein. (45)



Tabelle 1 : Verteilung der Markerenzyme

|                                                                    | n  | Sarkolemm      | Mitochondr.      | Mikrosomen       |
|--------------------------------------------------------------------|----|----------------|------------------|------------------|
| Strophantin hemmbare<br>(Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> )- ATPase | 29 | 29,2 $\pm$ 1,9 | n.n.             | 13,0 $\pm$ 1,2   |
| SDH                                                                | 24 | 17,6 $\pm$ 2,6 | 219,8 $\pm$ 12,4 | 90,4 $\pm$ 9,9   |
| Alkal-Phosphatase                                                  | 7  | 25,8 $\pm$ 2,9 | 41,3 $\pm$ 3,4   | 302,9 $\pm$ 76,9 |
| n.n. : nicht nachweisbar                                           |    |                |                  |                  |
| Aktivitäten in mE/mg Prot.                                         |    |                |                  |                  |

Die Abb. 2a-c zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fraktionen.

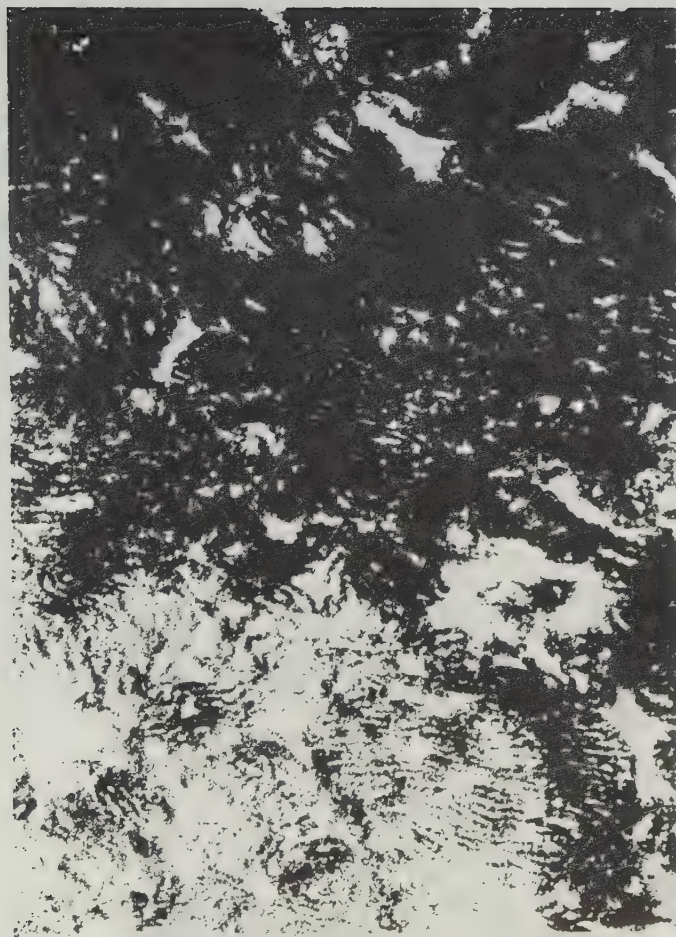
Abb. 2a zeigt ein verzweigtes, netzartiges System von Membranen, die zum Teil doppeläufig angeordnet sind.

In Abb. 2b erkennt man kugelige bis stäbchenförmige Körperchen, deren Außenmembranen sich scheibenförmig senkrecht zur Längsachse des Körperchens nach innen erstrecken und dieses größtenteils ganz durchqueren.

Abb. 2c zeigt Formationen von glatten und rauhwandigen, allseitig geschlossenen, sphärischen Bläschen, sowie Mitochondrienfragmente und andere Zelltrümmer.



Abb. 2a



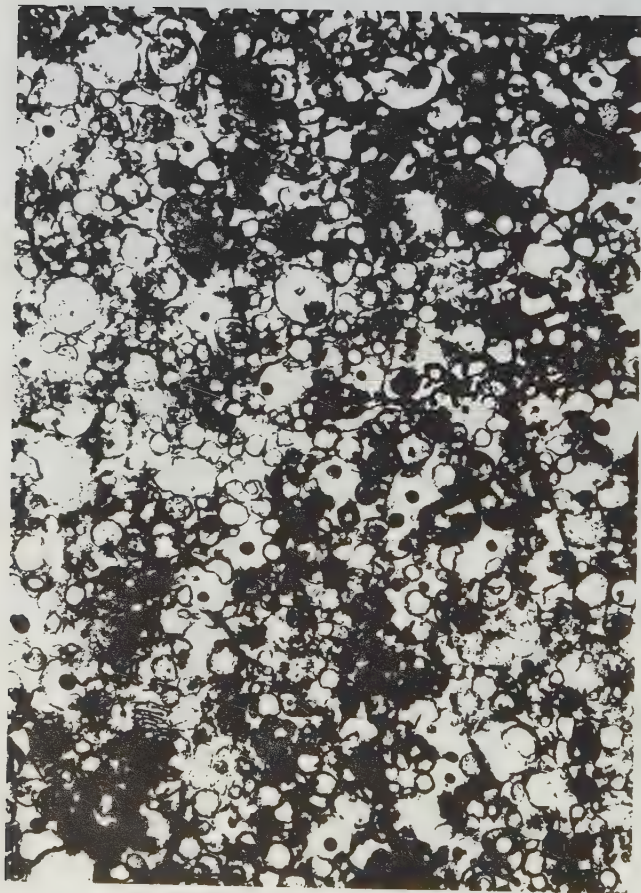


Abb. 2c

## V. HERSTELLUNG von TRIS - ATP

Über eine Säule von Amberlite IR 120 H-Resin (British Drug Houses Ltd) wurde in der Kälte 0,25 mMol  $\text{Na}_2\text{-ATP}$ / 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. geschichtet. Dann wurde die Säule mit 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. ausgewaschen.

Das gesamte Eluat wurde aufgefangen, mit Tris-Substanz auf pH 7,4 eingestellt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. aufgenommen und der ATP-Gehalt bestimmt.

Zu 0,1 ml einer 1:50 Verdünnung der ATP-Lösung wurde gegeben:

|                             |        |        |
|-----------------------------|--------|--------|
| Tris HCl (pH 7,4)           | 0,1 ml | 500 mM |
| D-(+)-Glucose               | 0,1 ml | 100 mM |
| $\text{MgSO}_4$             | 0,1 ml | 50 mM  |
| NADP                        | 0,1 ml | 5 mM   |
| $\text{H}_2\text{O}$ bidest | 0,5 ml |        |
| Gesamtvolumen:              | 1,0 ml |        |

Zu diesem Ansatz wurden 10 E Hexokinase und 10 E Glucose-6-Phosphatdehydrogenase gegeben.

Die Extinktionen wurden am Eppendorf-Photometer nach 10 min bei 334 nm abgelesen (mikromolarer Extinktionskoeffizient:  $6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ ).

## VI. PROTEINBESTIMMUNG

Der Proteingehalt der Enzyme wurde mit einer modifizierten Biuretmethode ermittelt

Testprinzip:

- Dioxan löst das Protein aus den Lipoproteinmembranen
- quantitative Bestimmung des Proteins durch die Biuretreaktion

Testlösungen:

Biuret-Reagens, Dioxan, 0,3 M TCE, Phosphatstandard (Labtrol<sup>R</sup>)

Test:

0,05 ml Homogenat wurde mit 1 ml Dioxan 5 min. gerüttelt und dann zentrifugiert (Eppendorf 2 min). Der Überstand wurde verworfen. Niederschlag + 1 ml 0,3 M TCE wurden erneut 5 min gerüttelt, zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Zum Niederschlag wurde 1 ml Biuret-Reagens gegeben und ca. 30 min gerüttelt, bis der Niederschlag vollständig gelöst war.

Die Extinktion wurde bei 546 nm im Photometer mit der Absaugküvette gemessen. Als Leerwert diente 1 ml Biuret-Reagens, als Standard 0,05 ml Labtrol<sup>R</sup> statt Probe.

Die Berechnung des Proteingehalts erfolgte nach folgender Formel:

$$c_{\text{Probe}} = E_{\text{Probe}} \cdot \frac{0,7 \text{ mg/ml}}{\Delta E_{\text{Labtrol}}}$$

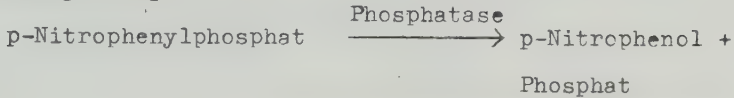


## VII. ENZYMMESSUNGEN

### 1. Alkalische Phosphatase

nach Walter, K. und Schütt, C. (52)

Testprinzip:



Die nach einer bestimmten Zeit freigesetzte p-Nitrophenol-Menge ist proportional der Phosphatase-Aktivität und kann auf Grund seiner gelben Farbe bei 405 nm bestimmt werden.

Testlösungen:

1 M Diäthanolamin, 15 mM 4-Nitrophenylphosphat,  
1 N HCl, 30 % TCE, 1 N NaOH

Test:

Die Puffer-Substrat-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt: 10,514 g Diäthanolamin + 0,557 g 4-Nitrophenylphosphat + 9 ml 1 N HCl wird in 80 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, mit 1 N HCl auf pH 9,8 eingestellt und mit H<sub>2</sub>O bidest. ad 100 ml aufgefüllt.

0,1 ml des Puffer-Substrat-Gemisches werden mit 0,01 ml Membranprotein 10 min bei 25° C inkubiert. Als Stopplösung werden 0,02 ml 30 % TCE und 1 ml 1 N NaOH zugegeben. Darauf folgt eine Zentrifugation (Eppendorf; 2 min). 1 ml des Überstandes wird in eine Absaugküvette pipettiert und bei 405 nm im Eppendorf-Photometer abgelesen.

## 2. $\text{Ca}^{++}$ -ATPase

nach Dietze, G. und Hepp, K.D. (6)

Testprinzip:



Die Menge des freigesetzten anorganischen Phosphats wird mit Hilfe des Phosphattests (s.u.) gemessen und ist proportional der ATPase-Aktivität.

Testlösungen:

500 mM Tris HCl, (pH 7,4) 30 mM ATP-Tris, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ ,  
5 mM EDTA-Tris, 55 % TCE, Phosphatstandard (Labtrol<sup>R</sup>)

Test:

|                |                 |                 |
|----------------|-----------------|-----------------|
| Je 0,01 ml von | Tris-HCl        | (50 mM im Test) |
|                | ATP-Tris        | ( 3 mM i. T. )  |
|                | $\text{CaCl}_2$ | ( 2 mM i. T. )  |
|                | EDTA-Tris       | (0,5mM i. T. )  |

werden mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. auf 0,1 ml aufgefüllt.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,01 ml Fraktion (Sarkolemm: 0,02 ml) gestartet und nach 20 min Inkubationszeit bei 37° C gestoppt.

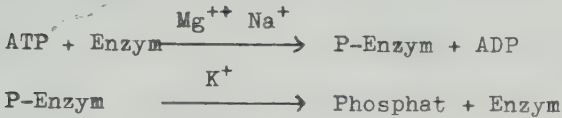
Als Kontrolle dient ein Phosphatstandard mit Labtrol<sup>R</sup>. Gestoppt wird mit 0,02 ml 55 % TCE. Nach der Zentrifugation (Eppendorf; 2 min) erfolgt die Messung des freigesetzten Phosphats mit dem Phosphattest. (s.u.)



### 3. ( $Mg^{++} + Na^{+} + K^{+}$ ) - ATPase

nach Post, R.L. und Sen, A.K. (35)

Testprinzip:



Die Menge des freigesetzten anorganischen Phosphats wird mit Hilfe des Phosphattests (s.u.) gemessen und ist proportional der ATPase-Aktivität.

Testlösungen:

500 mM Tris-Cl, (pH 7,4) 30 mM ATP-Tris, 5 mM EDTA-Tris,  
100 mM  $MgCl_2$ , 1,4 M NaCl, 140 mM KCl, 55 % TCE

Test:

|                |           |                 |
|----------------|-----------|-----------------|
| Je 0,01 ml von | Tris-Cl   | (50 mM im Test) |
|                | ATP-Tris  | (3 mM i. T. )   |
|                | EDTA-Tris | (0,5 mM i. T. ) |
|                | $MgCl_2$  | (10 mM i. T. )  |

werden mit  $H_2O$  bidest. auf 0,08 ml aufgefüllt.

Die Reaktion wird mit 0,02 ml Fraktion gestartet und 20 min bei  $37^{\circ}C$  inkubiert.

Für die ( $Mg^{++} + Na^{+} + K^{+}$ ) - ATPase werden zusätzlich zum genannten Testensatz 0,01 ml NaCl (140 mM i.T.)  
0,01 ml KCl (14 mM i.T.)

gegeben, wobei  $H_2O$  bidest. entsprechend reduziert wird, um das Testvolumen von 0,1 ml konstant zu halten.

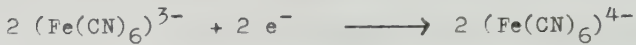
Als Stoppsubstanz werden 0,02 ml 55 % TCE verwendet.

Nach der Zentrifugation (Eppendorf; 2 min) erfolgt die Messung des freigesetzten Phosphats mit dem Phosphattest. (s.u.)

#### 4) Succinatdehydrogenase (SDH)

nach SINGER, T&P. et al. (42)

Testprinzip:



| Test:                                                              | mM  | ml   | mM i.Test |
|--------------------------------------------------------------------|-----|------|-----------|
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7.4 | 200 | 0,50 | 54        |
| Titriplex III (EDTA-Na)                                            | 83  | 0,06 | 2,7       |
| KCN                                                                | 15  | 0,08 | 0,65      |
| $\text{MgCl}_2$                                                    | 125 | 0,08 | 5,4       |
| $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$                               | 125 | 0,08 | 5,4       |
| Fraktion                                                           | -   | 0,05 | -         |
| Succinat                                                           | 250 | 1,00 | 135,0     |

Testvolumen: 1,85 ml

Nach 10 min Vorlauf bei 25°C wird die Reaktion mit der Succinatlösung gestartet. Die Aktivität der SDH ergibt sich aus der Aktivitätsabnahme/min bei 25°C bei Verwendung eines Filters von 405 nm Wellenlänge.  
( $\epsilon = 0,896 \text{ (cm}^2/\text{uMol)}$ )

## 5. PHOSPHATTEST

Der Phosphattest ist eine Farbreaktion zur Messung anorganischen Phosphats nach Müller, E. (29)

Der Phosphattest schließt sich an die Messung der Enzymaktivitäten an, da mit seiner Hilfe das durch die  $\text{Ca}^{++}$ - oder  $(\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$  gebildete Phosphat bestimmt wird.

Testlösungen:

Amidol<sup>R</sup> ( 0,5 % in 5 % Natriumsulfit),

Ammoniummolybdat (2,5 % in 5 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ),

Phosphatstandard (Labtrol<sup>R</sup>)

Test:

0,1 ml Überstand, 0,02 ml Amidol<sup>R</sup>, 0,75 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. und 0,1 ml Ammoniummolybdat als Startsubstanz werden 7 min bei 37° Celsius inkubiert.

Die Reaktion wird durch Umsetzen der Röhrchen ins Eisbad gestoppt. Die Messung der Extinktion im Eppendorf-Photometer erfolgt bei 578 nm bei Zimmertemperatur mit der Absaugküvette.

## VIII. AKTIVITÄTSBERECHNUNGEN der ATPasen

Die Aktivitäten wurden in mE/mg Protein nach folgender Formel errechnet:

$$A = \frac{\Delta E}{\epsilon} \cdot f \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{\text{mg Protein/ml}}$$

$$\text{wobei } f = \frac{(TV + V_{TCE}) \cdot V_K}{EV \cdot V_A}$$

A = spezifische Aktivität  $\hat{=}$  mE/mg Protein

TV = Testvolumen

EV  $\neq$  Einsatzvolumen

V<sub>TCE</sub> = Volumen der Stopplösung TCE

V<sub>K</sub> = Volumen in der Küvette (1 ml beim Phosphattest)

V<sub>A</sub> = Volumen des Aliquots (enteiweißter Überstand)

t = Testdauer

$\epsilon$  = mikromolarer Extinktionskoeffizient von  
Phosphat ( cm<sup>2</sup> /  $\mu$ Mol)

## IX. STATISTIK

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit einem Olivetti-Computer-Programm.

Mit Hilfe des Student-t-Tests für unverbundene Stichproben wurden arithmetisches Mittel ( $\bar{x}$ ), die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM), sowie die Signifikanzen errechnet. Als signifikant wurde  $p < 0,05$  bezeichnet.

## C ) E R G E B N I S S E

### I. Alkalische Phosphatase

#### 1. Rechter Vorhof (Homogenat)

Wir untersuchten die Wirkung dreier Substanzen auf die alkalische Phosphatase des rechten Vorhofs, nämlich von Isoproterenol, Cycloheximid und Propranolol.

Isoproterenol stimuliert am Herzen selektiv die alkalische Phosphatase des rechten Vorhofs, d.h. es zeigt nur geringe Wirkung auf die alkalische Phosphatase des linken Vorhofs und keine Wirkung auf die alkalische Phosphatase der Ventrikel (31). Unsere Untersuchungen bestätigten, daß nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation durch eine einmalige Applikation von 40 mg Isoproterenol/kg Körpergewicht die Aktivität der alkalischen Phosphatase des rechten Vorhofs im frischen Homogenat um 86,4 % ansteigt.

Dieser Anstieg der Aktivität der alkalischen Phosphatase ist statistisch signifikant ( $p < 0.001$ ) und diente in sämtlichen Versuchen als Index für den Isoproterenoleffekt am Herzen. (Tab. 2, Abb. 3)

Cycloheximid hemmt die Proteinsynthese, indem es die Überführung der an t-RNA gebundenen Aminosäuren in die Polypeptidbindung verhindert. (2) Wenn der Effekt

von Isoproterenol auf verstärkter Proteinsynthese beruht, müsste er folglich durch Cycloheximid gehemmt werden können.

Wir fanden, daß Cycloheximid allein in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht auf die alkalische Phosphatase des rechten Vorhofs keinen Effekt zeigt. Cycloheximid in Kombination mit Isoproterenol ist aber in der Lage, den Stimulierungseffekt von Isoproterenol auf die alkalische Phosphatase zu hemmen.

(Tab. 2, Abb. 3)

Propranolol gehört in die Gruppe der  $\beta$ -Rezeptoren blockierenden Substanzen, die alle erregenden Wirkungen der Katecholamine am Herzen hemmen. Sie hemmen ferner die von Katecholaminen induzierte Lipolyse und Glykogenolyse. (54)

Wir fanden, daß Propranolol in einer Dosierung von 50 mg/kg Körpergewicht ohne Effekt auf die alkalische Phosphatase des rechten Vorhofs ist.

In Kombination mit Isoproterenol verabreicht, verhindert Propranolol einen Effekt von Isoproterenol auf die alkalische Phosphatase. (Tab. 2, Abb. 3)

Tab. 2 Alkalische Phosphatase des rechten Vorhofs;  
Effekt von Isoproterenol, Cycloheximid  
und Propranolol

| Vorbehandlung mit               | Aktivität<br>mE/mg Protein $\pm$ SEM | n  |
|---------------------------------|--------------------------------------|----|
| Kontrolle                       | 208 $\pm$ 1                          | 16 |
| Isoproterenol                   | 387 $\pm$ 15                         | 10 |
| Cycloheximid                    | 234 $\pm$ 24                         | 4  |
| Cycloheximid<br>+ Isoproterenol | 215 $\pm$ 18                         | 4  |
| Propranolol                     | 232 $\pm$ 21                         | 4  |
| Propranolol<br>+ Isoproterenol  | 230 $\pm$ 19                         | 4  |

Die Ergebnisse in Tab. 2 sind in Abb. 3 graphisch dargestellt.

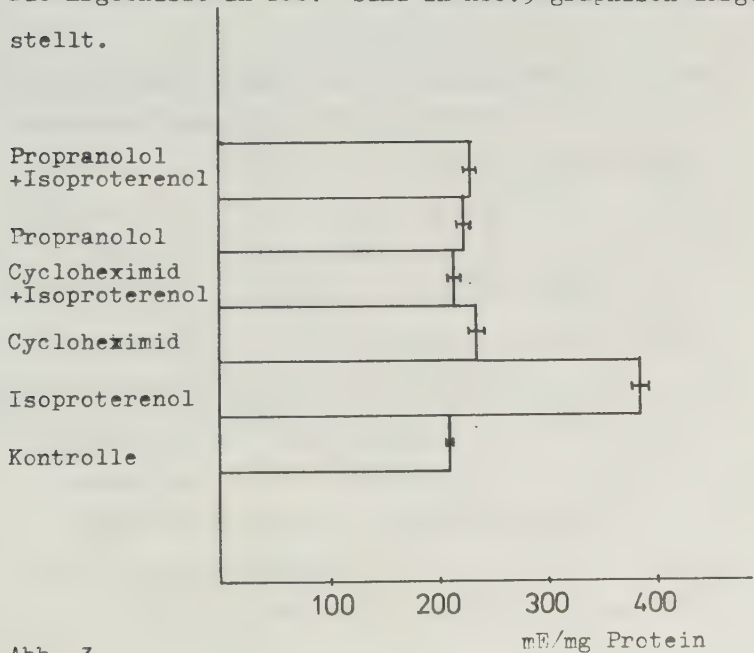


Abb. 3

## 2. Ventrikel

### a) Isoproterenolwirkung auf die alkalische Phosphatase des Ventrikelhomogenats

Die Untersuchungen am Ventrikelhomogenat zeigten, daß die alkalische Phosphatase des Ventrikels, im Gegensatz zum Anstieg der alkalischen Phosphatase des rechten Vorhofs, durch Isoproterenol nicht stimulierbar ist. (Tab. 3, Abb. 4)

Wir bestätigten damit die Ergebnisse von Müller et al. (1971) (31)

### b) Isoproterenolwirkung auf die alkalische Phosphatase der Zellorganellen

Nach der Bestätigung der Ergebnisse von Müller (1971), daß nämlich die alkalische Phosphatase im Ventrikelhomogenat durch Isoproterenol nicht stimulierbar ist, wurde die Frage gestellt, wie die alkalische Phosphatase in den einzelnen Fraktionen verteilt ist, und ob ein Isoproterenoleffekt nachweisbar ist.

In Abb. 4 wird die Verteilung der alkalischen Phosphatase in verschiedenen Myokardfraktionen dargestellt. Daraus geht hervor, daß die Aktivität der alkalischen Phosphatase in der Mikrosomenfraktion am größten ist, und zwar etwa 4mal so hoch wie im Homogenat. In den beiden anderen Fraktionen, Mitochondrien und Sarkolemm, ist die spezifische Aktivität der alka-



lischen Phosphatase dagegen deutlich niedriger als im Gesamthomogenat, (Tab.3 ,Abb.4 )

Die alkalische Phosphatase erweist sich also als subzellulär kompartimentiert.

Bei Isoproterenol-behandelten Tieren bestätigte sich das Resultat vom Gesamthomogenat:

Die alkalische Phosphatase der einzelnen Organellen ist durch Isoproterenol nicht signifikant stimulierbar. Die Verteilung der alkalischen Phosphatase ändert sich nicht.

Tab. 3            Verteilung der alkalischen Phosphatase  
in Myokardfraktionen der Ratte

|               | Vorbehandlung    |                  | n |
|---------------|------------------|------------------|---|
|               | Keine            | Isoproterenol    |   |
| Homogenat     | 74,9 $\pm$ 9,0   | 60,3 $\pm$ 6,9   | 4 |
| Sarkolemm     | 25,8 $\pm$ 2,9   | 26,2 $\pm$ 4,1   | 7 |
| Mitochondrien | 41,3 $\pm$ 3,4   | 43,2 $\pm$ 3,4   | 7 |
| Mikrosomen    | 302,9 $\pm$ 76,9 | 334,4 $\pm$ 84,8 | 7 |

alle Angaben in mE/mg Protein  $\pm$  SEM

In Abb. 4 sind die Daten von Tab. 3 graphisch dargestellt.

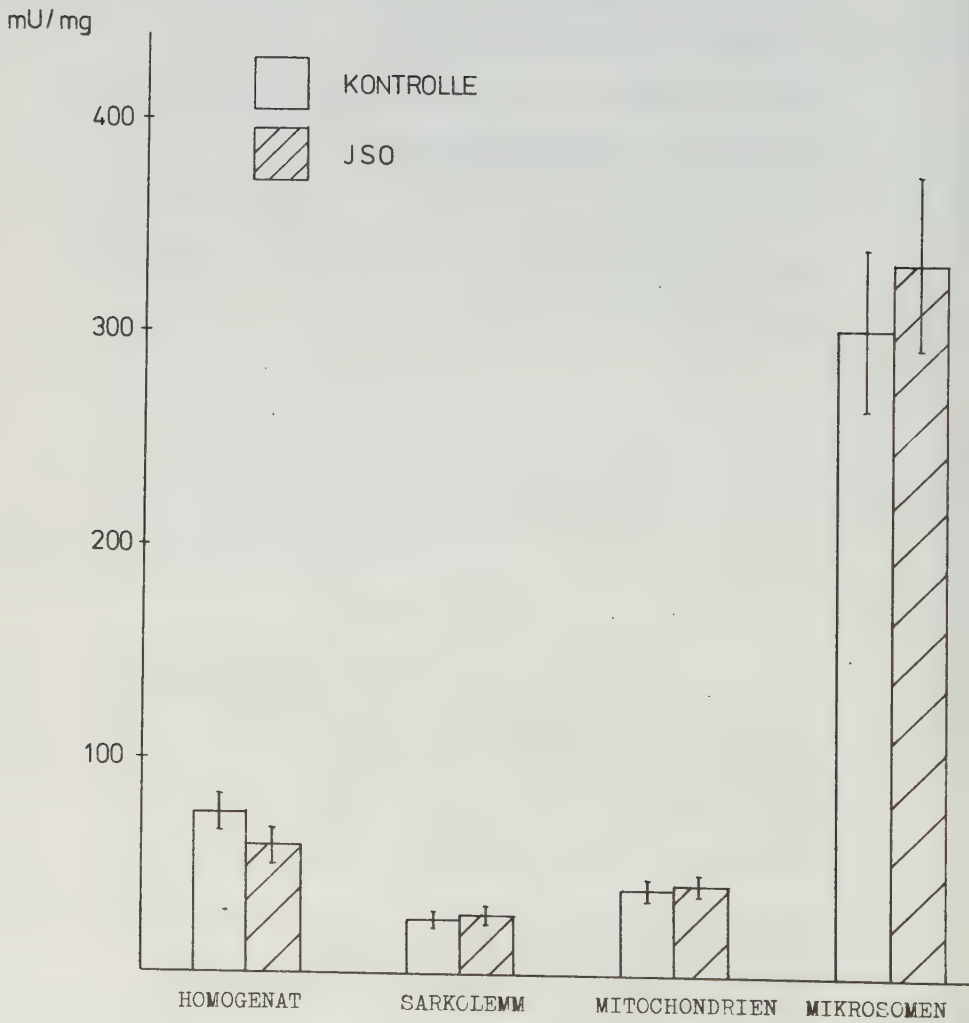


Abb. 4 Verteilung der alkalischen Phosphatase  
in Myokardfraktionen der Ratte

## II. $\text{Ca}^{++}$ - ATPase in Homogenat und Zellorganellen des Ventrikels

### 1. Verteilung

Wie aus Tab. 4 und Abb. 5 hervorgeht, verteilt sich die  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase sehr ähnlich auf die Organellfraktionen wie die alkalische Phosphatase.

Die größte Aktivität zeigt sich in der Mikrosomenfraktion.

Die spezifische Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase in der Mikrosomenfraktion ist um etwa das 7-fache, in der Mitochondrienfraktion um etwa das 2-fache höher, während sie in der Sarkolemmfraktion um etwa 50 % niedriger ist als im Homogenat.

Ebenso wie die alkalische Phosphatase erweist sich also die  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase als subzellulär kompartimentiert.

### 2. Isoproterenolwirkung auf die $\text{Ca}^{++}$ - ATPase

Homogenat: Die Isoproterenolvorbehandlung bewirkte eine erhöhte Freisetzung von anorganischem Phosphat aus ATP im Ventrikelhomogenat. Wir fanden eine signifikante Aktivitätssteigerung der  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase um 53 % ( $p < 0.01$ ) (Tab. 4)

Mikrosomen: Die Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase ist von Präparation zu Präparation großen Schwankungen unterworfen.

Wir fanden keine signifikante Änderung der Aktivität. (Tab. 4)

Mitochondrien: Die Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase wird durch Isoproterenol nicht signifikant gesteigert.

Sarkolemm: In der Sarkolemmfraktion wird die Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase durch Isoproterenol signifikant gesteigert  
( p 0.001 )

Dieser selektive Anstieg der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase in der Sarkolemmfraktion um 45,4 % scheint anzudeuten, daß es sich um einen spezifischen Effekt von Isoproterenol auf diesen Zellbestandteil handelt.

Tab. 4 Verteilung der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase in Homogenat und Zellorganellen des Ventrikels bei nicht-behandelten und Isoproterenol-behandelten Tieren

|               | Vorbehandlung |       |               |       | n |
|---------------|---------------|-------|---------------|-------|---|
|               | keine         |       | Isoproterenol |       |   |
| Homogenat     | 88,8 ±        | 4,6   | 123,0 ±       | 5,7   | 4 |
| Sarkolemm     | 33,5 ±        | 5,5   | 48,7 ±        | 7,6   | 7 |
| Mitochondrien | 185,8 ±       | 28,1  | 195,6 ±       | 34,4  | 5 |
| Mikrosomen    | 622,8 ±       | 153,5 | 468,0 ±       | 136,6 | 5 |

alle Angaben in mE/mg Protein ± SEM

In Abb. 5 sind die Daten von Tab. 4 graphisch dargestellt.

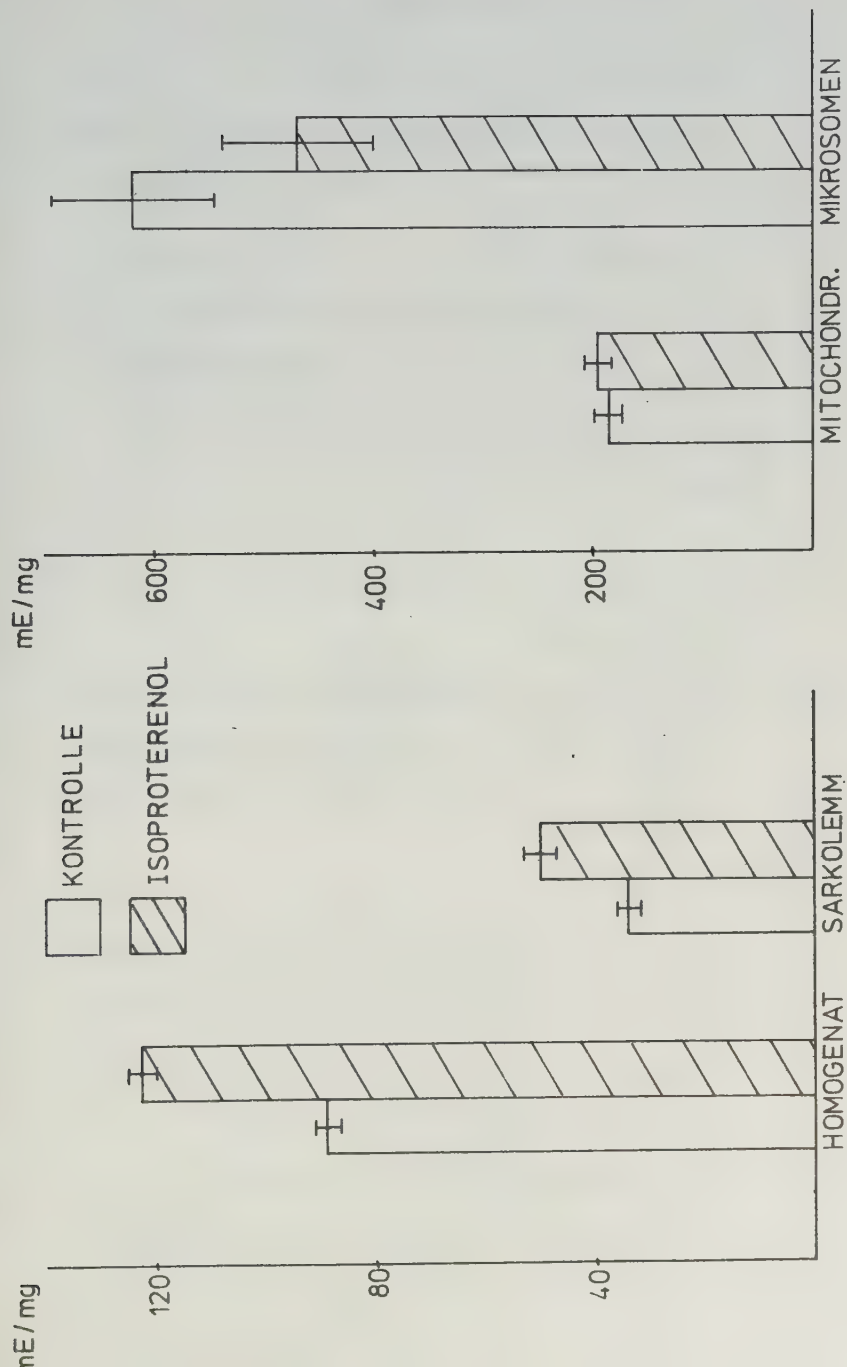


Abb. 5  
Verteilung der  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase

### III. ATPasen des Sarkolemmes

In der von uns isolierten Sarkolemmfraktion fanden sich hohe spezifische Aktivitäten der  $Mg^{++}$ -unabhängigen  $Ca^{++}$ -aktivierten ATPase, der  $Mg^{++}$ -ATPase und der  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase.

Wir untersuchten die Wirkung von Isoproterenol und Cycloheximid auf die verschiedenen ATPasen, um zu klären, ob es sich um einen spezifischen Effekt des Isoproterenol auf die  $Ca^{++}$ -ATPase oder um eine generelle Aktivierung membranständiger ATPasen handelt.

#### 1. Beeinflussung der $Ca^{++}$ -ATPase durch

##### a) Isoproterenol

Wie oben bereits beschrieben, wird die Aktivität der  $Ca^{++}$ -ATPase durch Isoproterenol signifikant gesteigert. Wir fanden einen Anstieg der Aktivität um 45,4 %, (Tab. 5)

##### b) Cycloheximid

In der oben angegebenen Dosierung und Applikationsweise hemmt Cycloheximid die basale Aktivität der  $Ca^{++}$ -ATPase um 34,1 %. (Tab. 5)

##### c) kombinierte Gabe von Isoproterenol und Cycloheximid

Nach gemeinsamer Applikation der beiden Stoffe war Isoproterenol nicht mehr in der Lage, die

Tab. 5  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase des Sarkolemms  
Effekt von Isoproterenol und Cycloheximid

|                                 | Aktivität               |   |
|---------------------------------|-------------------------|---|
| Vorbehandlung                   | mE/mg Protein $\pm$ SEM | n |
| Kontrolle                       | 33,5 $\pm$ 5,5          | 7 |
| Isoproterenol                   | 48,7 $\pm$ 7,6          | 7 |
| Cycloheximid                    | 22,1 $\pm$ 1,6          | 4 |
| Cycloheximid<br>+ Isoproterenol | 18,2 $\pm$ 0,9          | 4 |

Die Daten von Tab. 5 sind in Abb. 6 graphisch dargestellt.

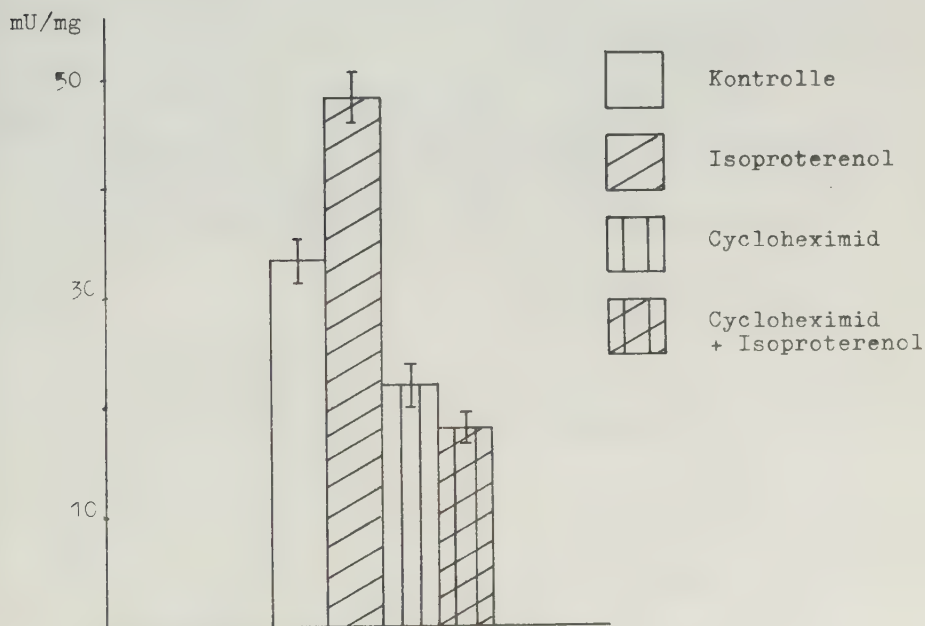


Abb. 6  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase des Sarkolemms  
Effekt von Isoproterenol und Cycloheximid

Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase zu stimulieren.

Der signifikante Hemmeffekt von Cycloheximid auf die Isoproterenol-stimulierte  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase beträgt 62,7 % (  $2p < 0,02$  ) ( Tab. 5 )

## 2. Beeinflussung der $\text{Mg}^{++}$ -ATPase durch

### a) Isoproterenol

Die  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase zeigt in ihrem Verhalten nach Isoproterenol-Stimulierung Ähnlichkeit mit der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase. Wir fanden, daß Isoproterenol die  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase signifikant um 50,8 % stimuliert. (  $p < 0,05$  ) ( Tab. 6 )

### b) Cycloheximid

Nach alleiniger Applikation von Cycloheximid kommt es zu einer signifikanten Verminderung der Aktivität der  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase, ähnlich wie wir es schon bei der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase beschrieben haben. Wir fanden eine Hemmung der basalen Aktivität um 75,4 %. (  $2p < 0,02$  ) ( Tab. 6 )

### c) kombinierte Gabe von Isoproterenol und Cycloheximid

Bei kombinierter Gabe beider Stoffe bleibt die Aktivität der  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase nahezu unverändert im Vergleich zur alleinigen Gabe von Cycloheximid. Der stimulierende Effekt von Isoproterenol wird durch Cycloheximid also aufgehoben. ( Tab. 6 )



Tab. 6  $Mg^{++}$ -ATPase des Sarkolemmms  
Effekt von Isoproterenol und Cycloheximid

| Vorbehandlung                   | Aktivität<br>mE/mg Protein $\pm$ SEM | n |
|---------------------------------|--------------------------------------|---|
| Kontrolle                       | $30,9 \pm 7,0$                       | 7 |
| Isoproterenol                   | $46,6 \pm 9,5$                       | 7 |
| Cycloheximid                    | $8,3 \pm 2,2$                        | 4 |
| Cycloheximid<br>+ Isoproterenol | $6,1 \pm 0,6$                        | 4 |

Die Daten von Tab. 6 sind in Abb.7 graphisch dargestellt.

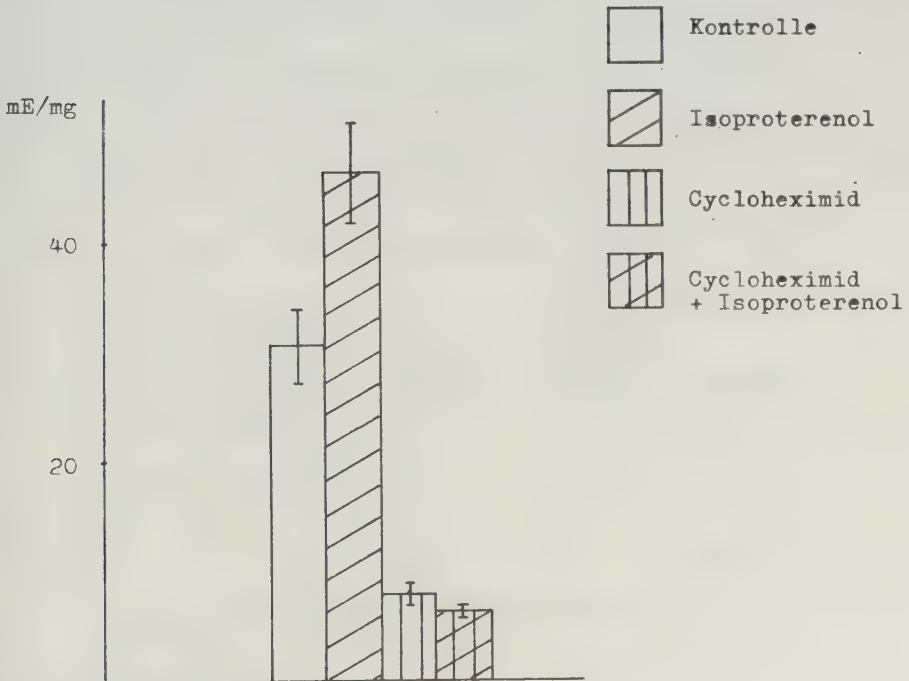


Abb. 7  $Mg^{++}$ -ATPase des Sarkolemmms  
Effekt von Isoproterenol und Cycloheximid

### 3. Beeinflussung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ durch

#### a) Isoproterenol

Setzten wir dem Test zur Messung der  $\text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$  noch Natrium (140 mM) und Kalium (14 mM) zu, so konnten wir die Aktivität einer  $(\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$  bestimmen. Diese wird durch Isoproterenol ebenfalls stimuliert.

Die  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$  jedoch wurde durch die Isoproterenol-Vorbehandlung nicht signifikant verändert. (Tab. 7)

#### b) Cycloheximid

Wie bei der  $\text{Ca}^{++} - \text{ATPase}$  und der  $\text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$  bewirkt Cycloheximid auch bei der  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$  eine Verminderung der Aktivität. Der Hemmeffekt beträgt 28,2 %. ( Tab. 7 )

#### c) kombinierte Gabe von Isoproterenol und Cycloheximid

Interessanterweise zeigt die  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$  bei Gabe beider Stoffe ein abweichendes Verhalten von den ATPasen, die wir testeten. Während Isoproterenol bei der  $\text{Ca}^{++} -$  wie bei der  $\text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$  nicht in der Lage war, die durch Cycloheximid gehemmte Aktivität zu steigern, bewirkt es bei der  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$  eine signifikante Stimulierung. (  $p < 0,001$  ) ( Tab. 7 )

Tab. 7             $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$  des Sarkolemm  
Effekt von Isoproterenol und Cycloheximid

| Vorbehandlung                   | Aktivität<br>mE/mg Protein $\pm$ SEM | n |
|---------------------------------|--------------------------------------|---|
| Kontrolle                       | 57,3 $\pm$ 9,3                       | 7 |
| Isoproterenol                   | 59,6 $\pm$ 10,9                      | 7 |
| Cycloheximid                    | 41,9 $\pm$ 1,2                       | 4 |
| Cycloheximid<br>+ Isoproterenol | 50,6 $\pm$ 2,4                       | 4 |

Die Daten von Tab. 7 sind in Abb. 8 graphisch dargestellt.

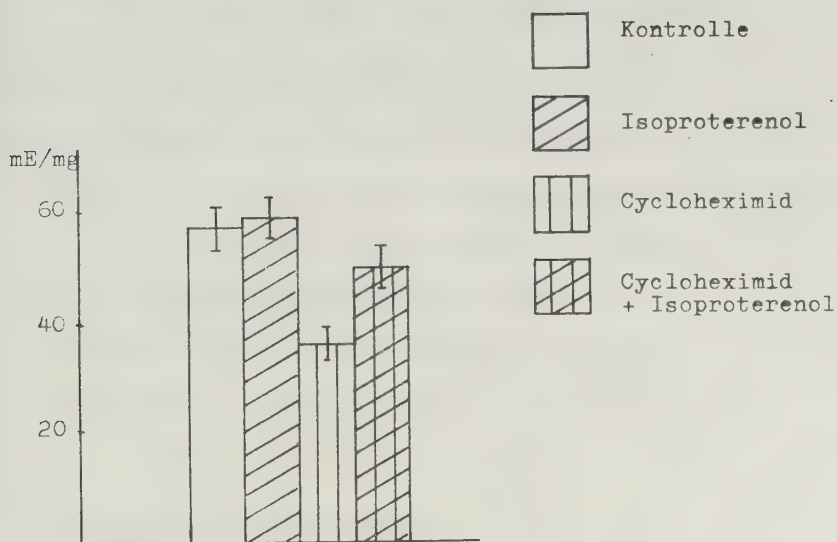


Abb. 8             $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$  des Sarkolemm  
Effekt von Isoproterenol und Cycloheximid

Aus den vorgelegten Untersuchungen über die Sarko-  
lemm-gebundenen ATPasen geht hervor, daß der  
Isoproterenol-Effekt nicht spezifisch für die  $\text{Ca}^{++}$  -  
aktivierte ATP-Hydrolyse ist.

Auch die  $\text{Mg}^{++}$  - ATPase wird aktiviert, jedoch nicht  
die  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$  - ATPase, die erst nach einer Vor-  
behandlung der Tiere mit Cycloheximid aktiviert wird.

Um näheren Aufschluß über die Wirkungsweise von Iso-  
proterenol auf die membrangebundenen, ATP-spaltenden  
Enzyme zu erhalten, wurde geprüft, ob die  $\text{Ca}^{++}$ - ATPase  
mit der  $\text{Mg}^{++}$ - bzw.  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$  - ATPase unter den ge-  
weiligen in vivo- Versuchsbedingungen korreliert ist.

#### IV. Untersuchung über die Beziehungen der Sarko- lemm-gebundenen ATPasen untereinander

##### 1. Beziehung zwischen $\text{Ca}^{++}$ -ATPase und $\text{Mg}^{++}$ -ATPase

In 22 Sarkolemm-Präparationen wurden gleichzeitig  
die Aktivitäten der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase und der  $\text{Mg}^{++}$ -  
ATPase gemessen.

Isoproterenol stimuliert die Aktivitäten beider  
Enzyme um annähernd gleiche Beträge. Die Akti-  
vität der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase wird um + 45,4 % und die  
der  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase um + 50,8 % gesteigert.

Cycloheximid reduziert beide Enzymaktivitäten,  
wobei auffällt, daß die Aktivität der  $\text{Mg}^{++}$  -  
ATPase etwa doppelt so stark reduziert wird, wie

die der  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase. Die Aktivität der  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase nimmt um -75,4 % ab, die der  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase um -34,1 %.

Bei Applikation von Isoproterenol + Cycloheximid, wobei Isoproterenol 1 Stunde später verabreicht wurde, sinkt die Aktivität der  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase um -86,9 %, während die Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase um -62,7 % abnimmt.

Trägt man die Werte beider Enzymaktivitäten in den einzelnen Präparationen gegeneinander in einem Diagramm ein, die  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase auf der Abszisse (x) und die  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase auf der Ordinate (y), so ergibt sich eine lineare Regression zwischen den beiden Enzymen. Bei einem Regressionskoeffizienten von 0,8285

(  $2\alpha < 0.001$  ) kann eine direkte Korrelation zwischen der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase und der  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase nachgewiesen werden, die der Gleichung  $y = 0,63 x + 16,02$  gehorcht. ( Abb. 9 )

## 2. Beziehung zwischen $\text{Ca}^{++}$ -ATPase und $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase

Bei einem Vergleich der Aktivitätsänderungen nach Isoproterenol, Cycloheximid- und Isoproterenol + Cycloheximid-Behandlung zwischen der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase und der  $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase läßt sich keine Korrelation feststellen. Nach Applikation von Isoproterenol erhöht sich die Aktivität der  $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase um + 4,1 % ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase: +45,4 %).

Cycloheximid bewirkt eine Abnahme der Aktivität um -28,1 % ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase: -34,1 %).

Cycloheximid + Isoproterenol verringern die Aktivität um -15,9 % ( $\text{Ca}^{++}$ -ATPase: -62,7 %).

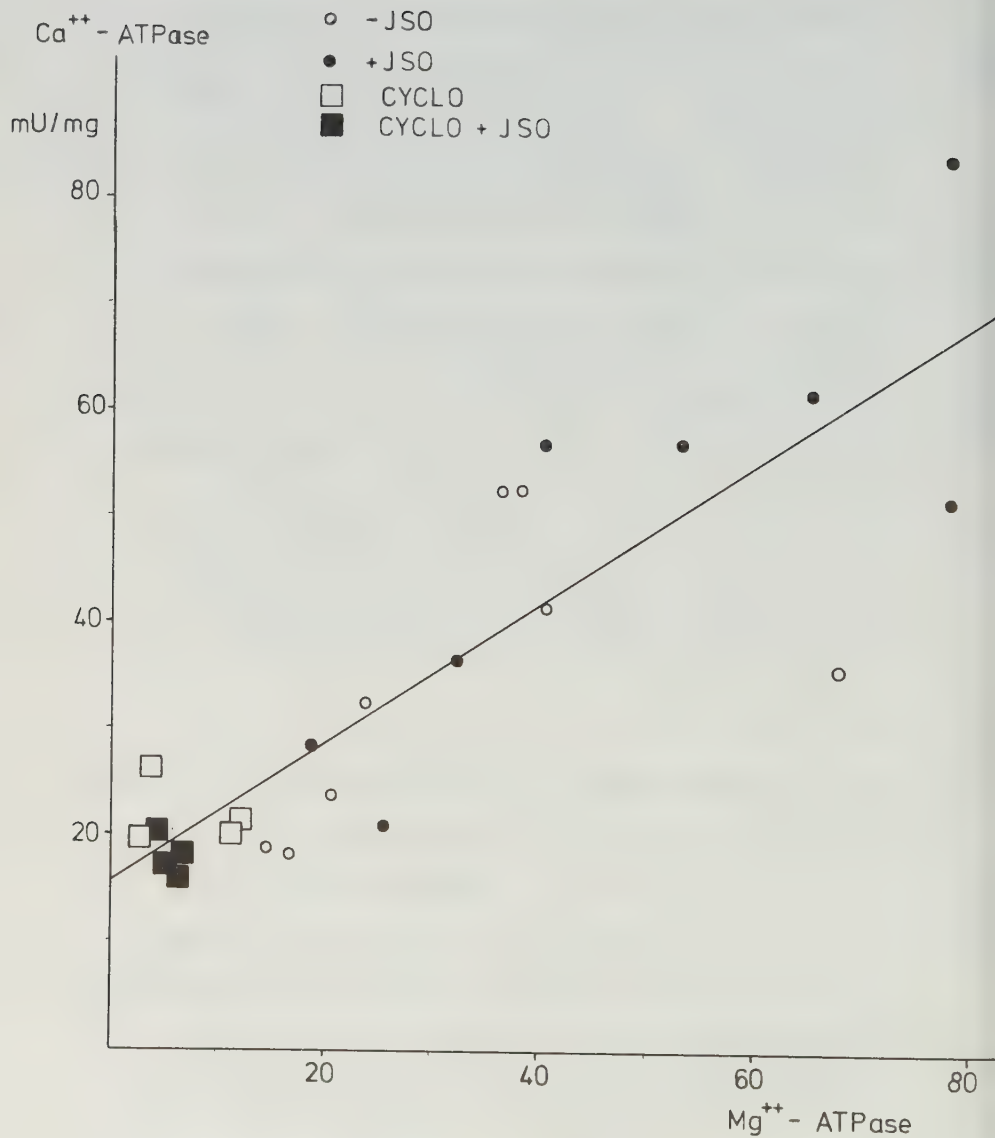


Abb. 9 Korrelation zwischen Ca<sup>++</sup>-ATPase und  
Mg<sup>++</sup>-ATPase des Sarkolemmas

## D) DISKUSSION

Müller et al. (31) haben 1971 erstmals einen stimulierenden Einfluß von Isoproterenol auf eine membran-gebundene Phosphatase am Herzgewebe beschrieben.

Sie beobachteten eine Aktivitätssteigerung der alkalischen Phosphatase in einem Autolysat des rechten Vorhofs des Rattenherzens durch eine einmalige Injektion von 40 mg/kg Isoproterenol. In geringerem Maße wird auch die Aktivität der alkalischen Phosphatase des linken Vorhofs, nicht aber die des Ventrikels stimuliert.

Dieser streng lokalisierte Stimulationseffekt um das 4-fache nach Isoproterenol-Behandlung gegenüber Kontrollen wurde mit der reicheren sympathischen Innervation des rechten Vorhofs im Vergleich zum linken Vorhof oder Ventrikel erklärt.

Diese Hypothese wird auch durch die Beobachtung bestätigt, daß die Fähigkeit exogener Katecholamine, die Aktivität der alkalischen Phosphatase des rechten Vorhofs zu steigern, mit der Ausdifferenzierung des sympathischen Nervensystems gekoppelt ist.

Bei neugeborenen Tieren, bei denen die adrenerge Innervation des rechten Vorhofs noch nicht ausgereift ist, fehlt eine Stimulierung der alkalischen Phosphatase durch Isoproterenol (30)

Müller et al. vermuteten, daß die alkalische Phosphatase des Herzmuskels in irgendeinem Zusammenhang

mit dem Kontraktionsvorgang des Herzens zu sehen sei, aufgrund ihrer Beobachtung der Enzymstimulation des positiv inotrop wirkenden Isoproterenol.

Die Funktion der alkalischen Phosphatase am Herzmuskel ist jedoch nicht bekannt.

Sicher ist, daß der Kontraktionsvorgang am Herzmuskel entscheidend durch  $\text{Ca}^{++}$  - Ionenverschiebungen beeinflusst wird. Diese transmembranösen  $\text{Ca}^{++}$  - Ströme werden durch spezifische  $\text{Ca}^{++}$  - Transport-ATPasen gesteuert.

Der direkte Nachweis der Transport-Funktion von  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasen ist bisher am Sarkoplasmatischem Retikulum und an Erythrozyten gelungen. (17) Die hier charakterisierten  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasen erwiesen sich als  $\text{Mg}^{++}$ -abhängig und  $\text{Ca}^{++}$ -stimulierbar. Ob die  $\text{Mg}^{++}$ -unabhängige  $\text{Ca}^{++}$ -stimulierbare ATPase Transport-Funktion hat, ist noch nicht sicher erwiesen. Derartige Enzyme wurden jedoch mehrfach in der Literatur beschrieben und in Zusammenhang mit dem  $\text{Ca}^{++}$ -Transport durch die Membran gebracht (14,35,41).

Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Fleckenstein (12) haben ergeben, daß der transmembranöse  $\text{Ca}^{++}$  - Einstrom am Herzen der Kontrolle durch  $\beta$ -Stimulatoren, wie zum Beispiel Isoproterenol, unterliegt.

Damit kann vermutet werden, daß sowohl die alkalische Phosphatase, als auch die  $\text{Ca}^{++}$  - Transport - ATPase von  $\beta$ -Stimulatoren kontrolliert werden.

Ein gemeinsamer Regulationsmechanismus wurde an



anderen Organen schon beschrieben. Nagode (32) beschrieb eine Aktivitätssteigerung der alkalischen Phosphatase und der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase des Knochens durch Vitamin D. Martin (26) fand, daß beide Enzyme im Bürstensaum des Darmes durch Vitamin D reguliert werden.

Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten in der Regulation beider Enzyme wurde von Haussler et al. (19) sogar angenommen, daß es sich um identische Enzyme handelt. Ausgehend von diesen Überlegungen wurde versucht, einen direkten Einfluß des Isoproterenol auf die  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase des Herzmuskels - in Parallele zur alkalischen Phosphatase - nachzuweisen.

Hierzu war es zunächst notwendig, die Ergebnisse von Müller mit unserem Testsystem und unserer Präparationsmethode von Rattenmyokard zu überprüfen.

Wir konnten die Ergebnisse von Müller et al. bestätigen, fanden aber nur einen Anstieg von 86 % nach Isoproterenol-Behandlung in der Aktivität der alkalischen Phosphatase des rechten Vorhofs, während Müller eine 4-fache Stimulation beschreibt. (31)

Die beiden Präparationsmethoden unterschieden sich hauptsächlich darin, daß wir auf die 18-stündige Autolyse verzichteten. Die Autolyse wurde nicht durchgeführt, da sie möglicherweise unterschiedlich stark bei nicht-behandelten und behandelten Tieren verläuft und damit auch zu unterschiedlichen Enzymaktivitäten führen könnte.

Ob die unterschiedliche Präparationstechnik allerdings die unterschiedliche Stimulierbarkeit der alkalischen Phosphatase verursachte, muß offenbleiben.

Ebenso wie Müller fanden wir nur eine Stimulierung der alkalischen Phosphatase des rechten Vorhofs, während die des Ventrikels von Isoproterenol nicht beeinflusst wurde.

Die Vorbehandlung der Tiere mit dem Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid hob die Isoproterenol-induzierte Aktivitätssteigerung der alkalischen Phosphatase völlig auf.

Dieser Effekt scheint darauf hinzudeuten, daß die Steigerung der Aktivität der alkalischen Phosphatase durch eine verstärkte Synthese von Enzymproteinen verursacht wird.

Ergänzend zu den Versuchen von Müller versuchten wir zu klären, ob Isoproterenol die alkalische Phosphatase über  $\beta$ -Rezeptoren stimuliert. Deshalb wurde einer Gruppe von Tieren eine Stunde vor der Applikation von Isoproterenol der  $\beta$ -Rezeptoren-Blocker Propranolol verabreicht. Wie zu erwarten, wirkt Isoproterenol über  $\beta$ -Rezeptoren, denn Propranolol ist in der Lage, den Stimulationseffekt von Isoproterenol auf die alkalische Phosphatase des rechten Vorhofs zu blockieren. (siehe Abb. 3)

Der selektive Anstieg der Aktivität der alkalischen Phosphatase des rechten Vorhofs war für uns der

Index für einen Isoproterenol-Effekt am Herzen in den darauffolgenden Versuchen, die zum Ziele hatten, die Ionentransport-ATPasen, insbesondere die  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, und ihre Beeinflußbarkeit durch Isoproterenol zu charakterisieren.

Zunächst untersuchten wir die Stimulierbarkeit der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasen des Homogenats durch Isoproterenol und fanden eine signifikante Stimulierung um 53 % ( siehe Abb. 5 )

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der Nicht-Stimulierbarkeit der alkalischen Phosphatase am Ventrikelhomogenat und schließt damit eine Identität der beiden Enzyme am Herzmuskel aus.

Wir stellten uns daraufhin die Frage, wo in der Zelle die  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasen lokalisiert sind und ob die Stimulierbarkeit durch Isoproterenol an bestimmte Membranfraktionen gebunden ist.

Zur Herstellung der Membranfraktionen wurde die Methode nach Stam (45) verwendet. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe von Markerenzymen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen geprüft. Die von uns gefundenen Werte über die Reinheit einer Fraktion stimmen mit vergleichbaren Angaben der Literatur gut überein.

Wie aus Abb. 3 und 5 zu ersehen ist, haben die  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasen eine sehr ähnliche Verteilung wie die alkalische Phosphatase in den Ventrikelfraktionen. Die größte spezifische Aktivität für beide Enzyme

findet sich in der Mikrosomenfraktion. Da es bekannt ist, daß das  $\text{Ca}^{++}$ -Transportsystem des Muskels größtenteils im endoplasmatischen Retikulum (Mikrosomenfraktion) lokalisiert ist, ist eine solche Verteilung zu erwarten. (16)

Die Funktion der alkalischen Phosphatase in dieser Fraktion ist bisher nicht bekannt.

Es gibt in der Literatur jedoch auch Hinweise, daß die Membranen des Sarkolemmes zum aktiven Transport befähigt sind. (15,49) Dementsprechend wurde von uns auch eine  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase in der Sarkolemmfraktion in geringerer spezifischer Aktivität gefunden. (Abb. 5) Aus derselben Abbildung geht hervor, daß die  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase des Sarkolemmes signifikant durch Isoproterenol stimuliert werden kann, während Isoproterenol auf die spezifische Aktivität der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase der anderen Membranfraktionen keinen signifikanten Einfluß zeigt, ebenso wie auf die alkalische Phosphatase in allen Membranfraktionen.

Der erhöhte  $\text{Ca}^{++}$ -Gehalt der Zelle nach Isoproterenol-Vorbehandlung, nach Fleckenstein Folge eines  $\text{Ca}^{++}$  - Einstroms in die Zelle, kann entweder durch vermehrten passiven Einstrom des extrazellulären  $\text{Ca}^{++}$  verursacht sein, oder aber durch einen verminderten aktiven  $\text{Ca}^{++}$  - Auswärtstransport durch Hemmung der  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase.

Unsere Untersuchungen deuten darauf hin, daß die  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase des Sarkolemmes nicht gehemmt, sondern stimuliert wird. Daraus ist zu folgern, daß primär

der Einstrom von  $\text{Ca}^{++}$  unter Isoproterenol stimuliert wird und sekundär die  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase angeregt wird, das in der Zelle vermehrte  $\text{Ca}^{++}$  nach außen zu transportieren.

Entsprechend dieser Interpretation unserer Ergebnisse als eine sekundäre Stimulierung der  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase konnten wir einen in-vitro-Effekt von Isoproterenol auf das Transportenzym nicht feststellen. Die stimulierte  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase könnte den von Kako (21), Fleckenstein (13) und Zimmer (54) beschriebenen Abfall des ATP-Spiegels als Folge eines verstärkten  $\text{Ca}^{++}$ -Influxes unter dem Einfluß  $\beta$ -sympathicomimetischer Amine wie Isoproterenol mitverursachen.

Dabei stellte sich Isoproterenol als der bei weitem stärkste  $\text{Ca}^{++}$ -Synergist heraus, der nicht nur eine exzessive  $\text{Ca}^{++}$ -Aufnahme, sondern auch eine gefährliche Verarmung des Myokards an energiereichem Phosphat, sowie Myokardnekrosen verursachen kann, wie sie zuerst von Rona et al. (38) beschrieben wurden.

In einer weiteren Reihe von Versuchen untersuchten wir, ob Isoproterenol die Aktivität der sarkolemmalen  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, ebenso wie die der alkalischen Phosphatase des rechten Vorhofes über eine vermehrte Proteinsynthese steigert.

Einen Hinweis darauf erbrachten die Versuche von Wood, Lindenmayer und Schwartz (53), die eine Steigerung der RNA-Synthese durch Isoproterenol am Myokard beobachten konnten.

Aus Abb. 6 ist ersichtlich, daß der Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid den Effekt von Isoproterenol auf die  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase des Sarkolemmes hemmt.

Es scheint sich also bei dem Isoproterenol-Effekt auf die  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase um einen Langzeiteffekt auf die ganze Zelle zu handeln, der in einem in-vitro-System nicht zu erwarten ist und dementsprechend von uns auch nicht gefunden wurde.

Falls Isoproterenol einen generellen unspezifischen Effekt auf die Proteinsynthese ausübt, müssten auch die anderen in der Sarkolemmfraktion vorhandenen Enzymsysteme beeinflusst werden.

Um diesen unspezifischen Einfluß auszuschließen, untersuchten wir den Effekt von Isoproterenol auf die  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase und  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$  des Sarkolemmes.

Die  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase gleicht in ihrem Verhalten nach Stimulierung durch Isoproterenol der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase, wie aus Abb. 7 ersichtlich ist.

Ein anderes Verhalten zeigt die  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ , die durch Isoproterenol-Behandlung in vivo nicht stimuliert wird. Wir befinden uns damit in Übereinstimmung mit Sulakhe et al. (48), dem es ebenfalls nicht gelang, einen Effekt auf dieses Enzym durch Einwirken verschiedener sympathicomimetischer Amine hervorzurufen.

Nach Vorbehandlung der Tiere mit Cycloheximid wird die Aktivität der  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$  jedoch durch

Isoproterenol signifikant stimuliert.

Isoproterenol hat keinen Einfluß auf die Enzymaktivitäten in-vitro, wobei wir uns im Widerspruch zu den Ergebnissen von Limas (25) befinden. Er beobachtete eine in-vitro-Hemmung der Aktivität der  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$  durch Katecholamine. Grund dafür ist möglicherweise eine unterschiedliche Präparationstechnik der Sarkolemmfraktion.

Aus diesen Ergebnissen ist zu folgern, daß Isoproterenol nicht einen unspezifischen Effekt auf die Proteinsynthese des Herzmuskels ausübt.

Wir fanden einen stimulierenden Effekt von Isoproterenol auf divalente Kationen-ATPasen, während die monovalenten Kationen-ATPasen durch Isoproterenol nicht beeinflußt werden.

Der "vermehrte  $\text{Ca}^{++}$ -Einstrom" ist mit unseren Untersuchungen nicht zu erklären, denn unsere Ergebnisse deuten eher auf einen durch  $\text{Ca}^{++}$ -Überschuß in der Zelle induzierten erhöhten  $\text{Ca}^{++}$ -Ausstrom über die Stimulierung der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase.

Der "vermehrte  $\text{Ca}^{++}$ -Einstrom" kann nach Fleckenstein (13) für die positiv inotrope Wirkung von Isoproterenol am Herzen verantwortlich gemacht werden.

Über diesen Mechanismus ist eventuell auch die positive Adaptation der Herzleistung im Stress zu erklären. Zugleich ist aber auch bekannt, daß Isoproterenol bei längerer Zufuhr in hoher Dosierung zu  $(\text{Ca}^{++}$ -bedingten) Herzmuskelnekrosen im Tierversuch

führen kann.

Diese Schädigung des Herzmuskels bei chronischer Anwendung von Isoproterenol wurde bisher in erster Linie auf eine ATP-Verarmung als Folge der  $\text{Ca}^{++}$  - bedingten Aktivierung der Aktomyosin-ATPase zurückgeführt. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dürfte der Aktivierung der sarcolemmalen  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase eine zusätzliche Rolle bei der Energieverarmung des Herzmuskels unter lang anhaltender  $\beta$ -Stimulation zukommen.



## E ) ZUSAMMENFASSUNG

Das Katecholamin Isoproterenol vermag die Aktivität der alkalischen Phosphatase des rechten Vorhofs im frischen Homogenat signifikant zu steigern, während es auf die alkalische Phosphatase des Ventrikelhomogenats keinen Einfluß hat. Damit konnten Ergebnisse von E.Müller bestätigt werden.

Wir konnten zeigen, daß Isoproterenol auch auf Triphosphatasen einen Einfluß hat.

Die  $\text{Ca}^{++}$ -stimulierte ATP-Spaltung im Ventrikelhomogenat wird durch Isoproterenol signifikant stimuliert. Isoproterenol hat keinen Effekt auf die ATPasen ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ ) der Organellfraktionen Mitochondrien und Mikrosomen.

Die Aktivitäten der sarkolemmgebundenen ATP-spaltenden Enzyme wie  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase und  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase werden durch Isoproterenol signifikant gesteigert, während die Aktivität der ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase unbeeinflusst bleibt. Die von divalenten Kationen aktivierten ATPasen des Sarkolemm werden also von Katecholaminen kontrolliert, im Gegensatz zu der von monovalenten Kationen aktivierten ATPase.

Der Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid hemmt die basale Aktivität der sarkolemmalen  $\text{Ca}^{++}$ - und der  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase und verhindert eine Stimulierung durch Isoproterenol. Die durch Isoproterenol bedingte Stimulierung beider ATPasen scheint also über eine

verstärkte Proteinsynthese zu erfolgen.

Die Aktivierung der  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase und damit der vermehrte Auswärts-Transport von  $\text{Ca}^{++}$  dürfte ein sekundäres Phänomen des von Fleckenstein beobachteten vermehrten  $\text{Ca}^{++}$ -Einstroms unter Isoproterenol sein.

Die von uns nachgewiesene vermehrte ATP-Spaltung unter Isoproterenol durch Aktivierung der sarkolemmalen  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase könnte somit, neben den bereits bekannten Isoproterenol-Effekten, zu einer weiteren ATP-Verarmung von Herzmuskelzellen führen.

F) L I T E R A T U R

- 1) Brostrom, M.A.; Reimann, E.M.; Walsh, D.A.; Krebs, E.G.  
A cyclic 3',5'-AMP-stimulated proteinkinase  
from heart muscle  
Adv. Enz. Regul. 191-203 (1970)
- 2) Collins, J.F.  
Antibiotics, proteins and nucleic acids  
Brit. Med. Bull. 31, 223 (1965)
- 3) Csapo, Z.; Dusek, J.; Rona, G.  
Early alterations of the cardiac muscle  
cells in isoproterenol-induced necrosis  
Arch. Path. 93, 356-365 (1972)
- 4) Cummings, J.R.  
Electrolyte change in heart tissue and  
coronary arterial and venous plasma  
following coronary occlusion  
Circulat. Res. 8, 865-870 (1960)
- 5) Dhalla, N.S.; Mc Namara, D.B.; Anand, M.B.  
Heart sarcolemma as a dynamic excitable  
membrane  
Rec. adv. stud. cardiac struct. metab. 2,  
1-19 (1976)
- 6) Dietze, G.; Hepp, K.D.  
Calcium stimulated ATPase of cardiac  
sarcolemma  
Biochem. biophys. Res. Commun. 44,  
1041-1049 (1971)

- 7) Dietze, G.; v.Funcke, H.J.; Hepp, K.D.; Mehnert, H.  
Studien zum positiv inotropen Wirkungs-  
mechanismus von Katecholaminen  
Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. 39,  
157-161 (1973)
- 8) Dusek, J.; Boutet, M.; Rona, G.  
Ultrastructural changes in isoproterenol-  
induced atrial necrosis  
Rec. adv. stud. cardiac struct. metab. 2,  
423-432 (1973)
- 9) Ebashi, S.; Kodama, A.  
A new protein factor promoting aggregation  
of tropomyosin  
J. Biochem. (Tokyo) 58, 107-108 (1965)
- 10) Epstein, S.E.; Levey, G.S.; Skelton, C.L.  
Adenylcyclase and cyclic AMP. Biochemical  
links in the regulation of myocardial  
contractility  
Circulation 43, 437-450 (1971)
- 11) Fleckenstein, A.  
Die Bedeutung der energiereichen Phosphate  
für Kontraktilität und Tonus des Myokards  
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 70, 81 (1964)
- 12) Fleckenstein, A.  
Neuere Ergebnisse zur Physiologie, Pharmako-  
logie und Pathologie der elektromechanischen  
Koppelungsprozesse im Warmblütermyokard  
Votr. d. Erlanger Physiologentagung 1970  
Hrsg. W.D. Keidel u. K.H. Plattig (1970)

- 13) Fleckenstein, A.; Janke, J.; Döring, H.; Leder, O.  
Key role of  $\text{Ca}^{++}$  in the production of  
noncoronaryogenic myocardial necrosis  
Rec. adv. stud. cardiac struct. metab. 6,  
21-31 (1975)
- 14) Formby, B.; Capito, K.; Egeberg, J.; Hedeskov, C.J.  
 $\text{Ca}^{++}$ -activated ATPase activity in subcellu-  
lar fractions of mouse pancreatic islets  
Amer. J. Phys. 230, No.2 (1976)
- 15) Funcke v., H.J.; Rattenhuber, E.  
Stimulierung des aktiven Calciumtransports  
am Herzmuskelsarkolemm durch c'AMP-abhängi-  
ge Proteinkinase  
Verh. dtsh. Ges. Kreislaufforsch. 42,  
120-126 (1976)
- 16) Harigaya, S.; Schwartz, A.  
Rate of calcium binding and uptake in  
normal animal and failing human cardiac  
muscle  
Circ. Res. 25, 781-794 (1969)
- 17) Hasselbach, W.  
Die sarkoplasmatische Calciumpumpe  
Drug Research 22, 2013-2057 (1972)
- 18) Hasselbach, W.; Makinose, M.  
Die  $\text{Ca}^{++}$ -Pumpe der Erschlaffungsgrana des  
Muskels und ihre Abhängigkeit von der  
ATP-Spaltung  
Biochem. Z. 333, 518 (1961)

- 19) Haussler, M.R.; Nagode, L.A.; Rasmussen, R.  
Induction of intestinal brush border  
alkaline phosphatase by vitamin D and  
identity with  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase  
Nature, 228, 1199-1201 (1970)
- 20) Hüttner, J.; Rona, G.; More, R.H.  
Fibrin deposition within cardiac muscle  
cells in malignant hypertension  
Arch. Path. 91, 19-28 (1971)
- 21) Kako, K.  
The effect of a  $\beta$ -adrenergic blocking  
agent on chemical changes in isoproterenol-  
induced myocardial necrosis  
Can. J. Physiol. Pharm. 44, 678-682 (1966)
- 22) Katz, A.M.  
Purification and properties of a tropo-  
myosin-containing protein fraction that  
sensitizes reconstituted actomyosin to  
calcium-binding agents  
J. Biol. Chem. 241, 1522-1529 (1966)
- 23) Kono, T.; Colowick, S.P.  
Isolation of skeletal muscle cell mem-  
brane and some of its properties  
Arch. Biochem. Biophys. 93, 520-533 (1951)
- 24) Kuo, J.F.; Krueger, B.K.; Sanes, J.R.; Greengard, P.  
Cyclic nucleotide-dependent protein kinases  
Biochem. Biophys. Acta 212, 79-91 (1970)

- 25) Limas, C.J.; Notargiacomo, A.V.; Cohn, J.N.  
Effect of cyclic 3'-5'-AMP on the  
(Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase of myocardial sarcolemma  
Cardiovasc. Res. 7, 477-481 (1973)
- 26) Martin, D.L.; Melancon, M.J.; DeLuca, H.F.  
Vitamin D stimulated, calcium-dependent  
adenosine triphosphatase from brush  
borders of rat small intestine  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35,  
819-823 (1969)
- 27) Matsui, H.; Schwartz, A.  
Purification and properties of a highly  
active ouabain sensitive Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-dependent  
ATPase from cardiac tissue  
Biochim. Biophys. Acta 128, 380-390 (1966)
- 28) Mc Collesster, D.L.  
A method for isolating skeletal-muscle  
cell membrane components  
Biochim. Biophys. Acta 57, 427-437 (1962)
- 29) Müller, E.  
Die Bestimmung der anorganischen Phosphate  
in kleinsten Serummengen  
Z. Kinderheilk. 57, 243-250 (1936)
- 30) Müller, E.; Pearse, A.G.E.; Moss, D.W.  
Rat atrial alkaline phosphatase activity  
and its response to isoproterenol during  
postnatal development  
J. Mol. Cell. Card. 4, 275-278 (1972)

- 31) Müller, E.; Pearse, A.G.E.; Moss, D.W.  
The inducible alkaline phosphatase of  
rat heart  
Biochem. J. 123, 895-900 (1971)
- 32) Nagode, L.A.; Haussler, M.R.; Boyce, D.W.  
Vitamin D induced phosphatases in bone  
and intestine: inhibitions by theophylline  
and diphosphonates  
Fed. Proc.; Abstract Nr. 694 (1970)
- 33) Nayler, W.G.; Dunnett, J.; Sullivan, A.  
Drug-induced changes in the superficially  
located stores of calcium in heart sarco-  
lemma  
Rec. adv. stud. cardiac struct. metab. 2,  
53-70 (1976)
- 34) Nijgar, M.S.; Pritchard, E.T.  
Calcium binding by a plasma membrane frac-  
tion isolated from rat submandibular glands  
Biochim. Biophys. Acta 323, 391-395 (1973)
- 35) Parkinson, D.K.; Radde, I.C.  
Properties of a  $\text{Ca}^{++}$ - and  $\text{Mg}^{++}$ -activated  
ATP-hydrolyzing enzyme in rat kidney cortex  
Biochim. Biophys. Acta 242, 238-246 (1971)
- 36) Post, R.L.; Sen, A.K.  
Sodium and potassium-stimulated ATPase  
Meth. of Enzymologie, Vol.X, 762 (1967)  
Editors: Colowick, S.P.; Kaplan, N.C.  
Academic Press Inc., N.Y.



- 37) Rabb, W.; Humphreys, R.J.; Lepeschkin, E.  
Potentiation of pressor effects of norepinephrine and epinephrine in man by deoxycorticosterone-acetate  
J. clin. invest. 29, 1397-1404 (1950)
- 38) Rona, G.; Chappel, C.J.; Balazs, T.; Gaudry, R.  
An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat  
Arch. Path. 67, 443-455 (1959)
- 39) Schlatz, L.; Marinetti, G.V.  
Calcium binding to the rat liver plasma membrane  
Biochim. Biophys. Acta 290, 70-83 (1972)
- 40) Selye, H.; Bajusz, E.  
Sensitization by potassium deficiency for the production of myocardial necrosis by stress  
Am. J. Path. 35, 525-535 (1959)
- 41) Shami, Y.; Radde, I.C.  
Calcium-stimulated ATPase of guinea pig placenta  
Biochim. Biophys. Acta 249, 345-352 (1971)
- 42) Singer, T.P.; Bernath, P.; Lusty, C.J.  
Bestimmung der SDH-Aktivität  
in: Methoden enzymatischer Analyse, 2.Aufl.  
1573-1578 (1970)  
Herausgeber: Bergmeyer, H.U.  
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße

- 43) Skelton, C.L.; Levey, G.S.; Epstein, S.E.  
Positive inotropic effects of dibutyryl-  
cyclic adenosine 3',5'-monophosphate  
Circ. Res. 26, 35-43 (1970)
- 44) Skou, J.C.  
Enzymatic basis for active transport of  
 $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  across cell membranes  
Physiol. Rev. 45, 596-617 (1965)
- 45) Stam, A.C.; Weglicki, W.B.; Feldmann, D.  
Canine myocardial sarcolemma - its  
preparation and enzymatic activity  
J. Mol. Cell. 1, 117-130 (1970)
- 46) Stanton, H.C.; Schwartz, A.  
Effects of a hydrazine monoamine oxidase  
inhibitor on isoproterenol-induced  
myocardiopathies in the rat  
J. Pharmacol. exp. Ther. 157, 649-658 (1967)
- 47) Sulakhe, P.V.; Drummond, G.J.; Ng, D.C.  
Calcium binding by skeletal muscle  
sarcolemma  
J. Biol. Chem. 248, 4150-4157 (1973)
- 48) Sulakhe, P.V.; Mc Namara, D.B.; Dhalla, N.S.  
Characterization of partially purified  
heart sarcolemmal ( $\text{Na}^+$  +  $\text{K}^+$ )-stimulated  
ATPase  
Rec. adv. stud. cardiac struct. metab. 9,  
279-302 (1976)

- 49) Sulakhe, P.V.; Leung, N.L.-K.; St.Louis, P.J.  
Stimulation of calcium accumulation in  
cardiac sarcolemma by protein kinase  
Can. J. Biochem. 54, 438-445 (1976)
- 50) Sutherland, E.W.; Robison, G.A.  
The role of cyclic 3',5'-AMP in responses  
to catecholamines and other hormones  
Pharmacol. Rev. 18, 145-161 (1966)
- 51) Tada, M.; Kirchberger, M.A.; Katz, A.M.  
Biochemical properties of cardiac sarco-  
lemma: Adenylate cyclase and ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-  
activated ATPase  
Rec. adv. stud. cardiac struct. metab. 9,  
117-131 (1976)
- 52) Walter, K.; Schütt, C.  
Alkalische Phosphatase im Serum  
in: Methoden enzym. Analyse, 2.Aufl.  
823-826 (1970) Hrsg.: Bergmeyer, H.U.  
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
- 53) Wood, W.G.; Lindenmayer, G.E.; Schwartz, A.  
Myocardial synthesis of ribonucleic acid  
I. Stimulation by isoproterenol  
J. Mol. Cell. Card. 3, 127-138 (1971)
- 54) Zimmer, H.G.; Steinkopff, G.; Gerlach, E.  
Veränderungen der myokardialen Adenin-  
nucleotid-Synthese durch Isoproterenol  
und Propranolol  
Verh. dtsh. Ges. Kreislaufforsch. 39,  
183-188 (1973)

Herrn Prof. Dr. H. Mehnert danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Priv.Doiz. Dr. K.D. Hepp möchte ich für die Übernahme des Referats, Herrn Dr. W. Kemmler für die Durchsicht der Arbeit herzlich danken.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanke ich mich bei Herrn Dr. Siess, München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H.J. v.Funcke für seine unentbehrliche Beratung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

## Lebenslauf

Am 11.2.1950 wurde ich, Johann Hermann Liebl, als Sohn des Kaufmanns Johann Liebl und seiner Ehefrau Emma Liebl, geb. Schweller, in Riedlhütte geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1956 bis 1960 in Bergen, Obb. Ab 1960 war ich Schüler des Staatl. Land-schulheims Marquartstein, wo ich 1969 das Abitur ablegte.

Nach dem Abitur erfolgte die Einberufung zur Bundeswehr, von der ich nach Erhalt eines Studienplatzes für Medizin im April 1970 entlassen wurde.

Ab dem Sommersemester 1970 studierte ich Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, legte im SS 1971 das Vorphysikum, im SS 1972 das Physikum ab. Nach einem klinischen Studium von 6 Semestern bestand ich am 18. Dezember 1975 das medizinische Staatsexamen.











